



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioala

OPINNÄYTETYÖ

**KEINOTEKOISTEN MAKEUTUSAINOIDEN MÄÄRITYS
YMPÄRISTÖNÄYTTEISTÄ SPE-UPLC-MS/MS-TEKNIIKALLA**

Työn tekijä: Riitta Mäkelä
Työn ohjaajat: Noora Perkola
Sami Huhtala
Mia Ruismäki

Työ hyväksytty: ____ . ____ . 2010

Mia Ruismäki
lehtori

ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Suomen ympäristökeskuksen Tutkimus- ja innovaatioyksikön Hakuninmaan laboratoriossa Helsingissä. Työn aihe oli minulle jo heti alusta lähtien kiinnostava ja mieleinen – sekä määritettävien yhdisteiden että analyysitekniikan kannalta. Uuden menetelmän kehitysprosessi aloitettiin tässä opinnäytetyössä aivan alusta, mikä teki tehtävästä haastavan mutta samalla myös hyvin opettavaisen.

Mahdollisuudesta toteuttaa tämä menetelmänkehitys esitän lämpimät kiitokseni yksikön päällikkö Pirjo Sainiolle, jota haluan kiittää myös koko työprosessin aikana saamastani tuesta ja kannustuksesta. Osoitan suuret kiitokseni myös tutkija Noora Perkolalle ja kemisti Sami Huhtalalle, jotka Tutkimus- ja innovaatiolaboratoriossa ohjasivat opinnäytetyöni käytännön toteutusta sekä kirjallisen osuuden laatimista. Heidän asiantuntemuksensa, tarkkanäköiset parannusehdotuksensa ja omistautumisensa yhteisten tavoitteiden saavuttamiseksi mahdollistivat tämän tutkimuksen onnistumisen. Lisäksi kiitän Tutkimus- ja innovaatiolaboratorion työyhteisöä mukavasta työilmapiiristä. Olen iloinen siitä, kuinka paljon kannustusta ja laboratoriotyöskentelyä helpottavia neuvoja sain koko henkilökunnalta.

Esitän kiitokseni ammattitaitoisesta ja innostavasta ohjauksesta myös Metropolia Ammattikorkeakoulun laboratorioalan koulutusohjelman lehtori Mia Ruismäelle, jonka kommentista oli paljon apua opinnäytteen lopullisen version työstämisessä.

Lopuksi haluan kiittää Maa- ja vesitekniikan tuki ry:tä, joka myönsi apurahan tämän opinnäytetyön toteutukseen.

Helsingissä 20.11.2010

Riitta Mäkelä

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Riitta Mäkelä	
Työn nimi: Keinotekoisien makeutusaineiden määrittäminen ympäristönäytteistä SPE-UPLC-MS/MS-tekniikalla	
Päivämäärä: 20.11.2010	Sivumäärä: 49 s. + 5 liitettä
Koulutusohjelma: Laboratorioala	
Työn ohjaajat: tutkija Noora Perkola, Suomen ympäristökeskus kemisti Sami Huhtala, Suomen ympäristökeskus lehtori Mia Ruismäki, Metropolia Ammattikorkeakoulu	
<p>Keinotekoisien makeutusaineiden käyttö elintarvikkeissa on viime vuosien aikana tullut yhä tavallisemmaksi. Ihmisen elimistö ei juurikaan pysty metaboloimaan näitä synteettisiä molekyylejä, eivätkä ne tutkimusten mukaan pidäyden vedenpuhdistusprosessiin vaan suurin osa kulkeutuu puhdistetun jäteveden mukana vesistöihin. Nämä yhdisteet ovat luonteeltaan hyvin stabiileja ja vesiliukoisia – ne säilyvät siten vesistöissä varsin pitkään. Tämä saattaa johtaa makeutusainepitoisuuksiin, joilla voi olla haitallisia vaikutuksia vesiekosysteemeissä. Tällä hetkellä ei vielä ole saatavilla riittävästi tutkimustietoa siitä, millaista stressiä eläin- ja kasvikunta kokee normaalia makeammassa ympäristössä.</p> <p>Opinnäytetyössä kehitettiin Suomen ympäristökeskuksen Tutkimus- ja innovaatiolaboratoriossa analyysimenetelmä, jolla voidaan mitata pinta- ja jätevesimatriisista neljän keinotekoisien makeutusaineen (asesulfaami-K, sakariini, sykramaatti ja sukraloosi) jäämätason pitoisuuksia. Esikäsittelymenetelmäksi valittiin kiinteäfaasiuutto (SPE) käänteisfaasi-adsorbentilla. Näytteet tulevat suodattua ennen uuttamista ja pH säädetään muurahaishapolla välille 2,4–2,6. Uuttotilavuudeksi optimoitiin 50 ml, eluointilavuudeksi 6 ml (MeOH) ja uutteen lopputilavuudeksi 0,2 ml (H₂O). Näytteen liuotintausta vaihdettiin metanolista veteen sentrifugaalihaihdutuksen avulla.</p> <p>Menetelmän laitetekniset mittaukset suoritettiin UPLC-MS/MS-yhdistelmätekniikalla. LC-erotuksen ajoliuksina käytettiin vettä (A) ja metanolia (B), joihin molempiin oli lisätty 2 mM ammoniumasetattia, joka paransi ionimuotoisten analyttien retentiot. Gradienttina oli 99,9 % A (2,0 min) → 0,1 % A (0,4 min) → 99,9 % A (0,6 min). LC- ja MS/MS-laitteistojen välinen liitäntä toteutettiin negatiivisella sähkösumutusionsaatiolla (ESI). Detektointimenetelmänä oli <i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM), jolla kustakin analyytistä seurattiin kahta spesifiä hajoamisreaktiota.</p> <p>Asesulfaami-K:n, sykramatin ja sukraloosin osalta saavutettiin saannot, jotka vaihtelivat välillä 75–95 %. Sakariinin kohdalla menetelmän suorituskykyä ei kuitenkaan onnistuttu saamaan yhtä korkealle tasolle: saanto jäi 27 %:iin. Haasteellisin osio saannon kannalta oli SPE-uutto. Sakariinin adsorptiota patruunaan yritettiin parantaa testaamalla muun muassa eri pH-olosuhteita, uuttotilavuuksia ja ionivahvuuksia. Ainoastaan uuttotilavuudella voitiin todeta olevan jonkinlaista vaikutusta sakariinin saantoon.</p> <p>Kalibrointi osoitettiin riittävän lineaariseksi (R^2 0,990–1,000). Mittausalue ylsi tarpeeksi matalalle tasolle ympäristönäytteiden todellisten makeutusainepitoisuuksien kannalta. Määritysrajoiksi (LOQ) arvioitiin asesulfaami-K:lle 1 ng/l, sakariinille 5 ng/l, sykramaatille 2 ng/l ja sukraloosille 7 ng/l. Menetelmään sovellettiin myös isotooppilaimennusmassaspektrometriaa (IDMS), mikä paransi menetelmän luotettavuutta.</p>	
Avainsanat: keinotekoiset makeutusaineet, kiinteäfaasiuutto, UPLC-MS/MS, IDMS	

ABSTRACT

Name: Riitta Mäkelä	
Title: Quantification of Artificial Sweeteners in Samples of Natural Environments Using SPE-UPLC-MS/MS Technique	
Date: 20 November 2010	Number of pages: 49 pp. + 5 attachments
Department: Laboratory Sciences	
Instructors: Researcher Noora Perkola, Finnish Environment Institute Chemist Sami Huhtala, Finnish Environment Institute Senior Lecturer Mia Ruismäki, Metropolia University of Applied Sciences	
<p>The use of artificial sweeteners has become more common in food and beverages in recent years. The human body practically can't metabolize these synthetic molecules and studies have shown that water treatment facilities can't eliminate them from waste water. Therefore, they finally end up to aquatic environment. Sweeteners are very stable and highly soluble in water so they will remain in the aquatic environment for quite some time. This could lead to concentrations which may have significant effects on the aquatic ecosystem. Currently we lack research data that would clarify how animals and plants are experiencing the environment that is much sweeter than normally.</p> <p>This thesis was carried out at the Finnish Environment Institute's Research and Innovation Laboratory. The aim of the study was to develop a method for the quantification of artificial sweeteners acesulfame potassium, saccharin, cyclamate and sucralose. The method was designed for measurements from surface water and municipal waste water at concentrations of residue level. Solid phase extraction (SPE) with reversed phase adsorbent was used for sample preparation. Before the extraction, the samples should be filtered and pH adjusted with formic acid to 2.4–2.6. The extraction volume was optimized to 50 mL, the elution volume to 6 mL (MeOH) and the final volume of the extract to 0.2 mL (H₂O). The solvent background was exchanged by centrifugal evaporation.</p> <p>The measurements were performed by UPLC-MS/MS. The LC-eluent were water (A) and methanol (B) both of which contained 2 mM ammonium acetate. An eluent additive was used because it improved retention for ionic compounds. The gradient was 99.9 % A (2.0 min) → 0.1 % A (0.4 min) → 99.9 % A (0.6 min). The interface between LC and MS/MS was carried out by electrospray ionization in negative ion mode (ESI). The detection method was Multiple Reaction Monitoring (MRM) and for each analyte two specific transitions were monitored.</p> <p>The recoveries for acesulfame potassium, cyclamate and sucralose varied between 75–95 %. In the case of saccharin the method was not as efficient: the recovery was only 27 %. The greatest challenge considering saccharin was the recovery of SPE. Many options to improve saccharin's adsorption were tested. For example, different pH conditions, extraction volumes and ionic strengths were tried out. The conclusion was that only the extraction volume had some impact on the recovery of saccharin.</p> <p>The linearity of calibration was proved to be sufficient (R^2 0,990–1,000). The measuring range reached a level that is low enough for samples of natural environments. Limits of quantification (LOQ) were 1 ng/L for acesulfame potassium, 5 ng/L for saccharin, 2 ng/L for cyclamate and 7 ng/L for sucralose. Isotopic Dilution Mass Spectrometry (IDMS) was also applied, which significantly improved the reliability of the method.</p>	
Keywords: artificial sweeteners, solid phase extraction, UPLC-MS/MS, IDMS	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

1	JOHDANTO	1
2	KEINOTEKOISET MAKEUTUSAINET JA YMPÄRISTÖ	2
2.1	Pysyvyys ja päätyminen ympäristöön	2
2.2	Vaikutukset ekosysteemissä ja ympäristöstä löydetyt pitoisuudet	3
2.3	Makeutusaineiden hyödyntäminen vesistötutkimuksissa	7
3	KATSAUS KEINOTEKOISTEN MAKEUTUSAINEIDEN ANALYTIikkaAN	8
4	MÄÄRITETTÄVÄT ANALYYTIT	10
4.1	Asesulfaami-K.....	10
4.2	Sakariini	10
4.3	Syklamaatti	11
4.4	Sukraloosi	11
5	MATERIAALIT JA LAITTEISTOT	13
5.1	Standardireagenssit	13
5.2	Laitteistot	15
5.3	Muut materiaalit	15
6	KEHITETTYYN MENETELMÄÄN SISÄLTYVÄT TEKNIIKAT	17
6.1	Kiinteäfaasiuutto (SPE)	17
6.2	Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (UPLC-MS/MS)	18
6.3	Isotooppilaimennusmassaspektrometria (IDMS)	21

7	MENETELMÄN KEHITTÄMISPROSESSI.....	24
7.1	Instrumenttianalyttiset parametrit	24
7.1.1	<i>Kolonne</i>	24
7.1.2	<i>Ajoliuos</i>	25
7.1.3	<i>Näytteen liuotintausta</i>	27
7.1.4	<i>Gradientti</i>	27
7.1.5	<i>Ionisaatio-olosuhteet</i>	29
7.1.6	<i>Detektoitavat ionit</i>	30
7.2	Kalibrointi.....	31
7.3	Näytteen esikäsittely	33
7.3.1	<i>Suodatus</i>	34
7.3.2	<i>SPE-patruunan ja eluointilavuuden valinta</i>	34
7.3.3	<i>Näytteen pH:n optimointi</i>	36
7.3.4	<i>Uuttotilavuus ja muut SPE:n saantoon vaikuttavat tekijät</i>	39
7.3.5	<i>Haihdutus ja sitä seuraavat toimenpiteet</i>	41
7.4	Sisäinen laadunohjaus.....	42
7.5	Yhteenvedo menetelmän toteutuksesta.....	43
7.6	Arvio menetelmän määrittämisrajoista	44
8	LOPUKSI	45
	VIITELUETTELO.....	46

LIITTEET

Liite 1	Laitteistokuvia
Liite 2	Ajoliuoksen CH₃COONH₄-optimointi
Liite 3	Näytteitä kromatogrammeista
Liite 4	Näyte kalibrointisuorista residuaaleineen
Liite 5	Yhteenvedo menetelmän toteutuksesta

LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

ACS	<i>Acesulfame</i> . Asesulfaami. Tässä työssä Asesulfaami-K.
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i> . Päivittäinen saantisuositus.
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> . Kapillaarielektroforeesi.
CH ₃ COONH ₄	<i>Ammonium Acetate</i> . Ammoniumasetaatti.
¹³ C-SAC	¹³ C-massaleimattu sakariini.
CYC	<i>Cyclamate</i> . Syklamaatti.
d-ACS	d ₄ -massaleimattu asesulfaami.
d-CYC	d ₁₁ -massaleimattu syklamaatti.
DDT	<i>Dichloro Diphenyl Trichloroethane</i> . Dikloori-difenyylitrikloorietaani.
d-SCL	d ₆ -massaleimattu sukraloosi.
GC	<i>Gas Chromatography</i> . Kaasukromatografia.
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic-Balanced</i> . Watersin [®] adsorbenttimateriaali.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
IC	<i>Ion Chromatography</i> . Ionikromatografia.
IDMS	<i>Isotopic Dilution Mass Spectrometry</i> . Isotooppilaimennusmassaspektrometria.
IPC	<i>Ion Pair Chromatography</i> . Ioniparikromatografia.
LOD	<i>Limit Of Detection</i> . Toteamisraja.
LOQ	<i>Limit Of Quantitation</i> . Määrittäysraja.
MeOH	<i>Methanol</i> . Metanoli.
Milli-Q-H ₂ O	Milliporen [™] laitteistolla tuotettu ultrapuhdas laboratoriovesi.
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> . Tandemmassalaitteiston mittaussuomenetelmä.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> . Massaspektrometria.
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> . Tandemmassaspektrometria.
m/z	<i>Mass to Charge Ratio</i> . Massa-varaussuhde.
PCB	<i>Polychlorinated Biphenyl</i> . Polykloorattu bifenyylit.
POP	<i>Persistent Organic Pollutant</i> . Pysyvä orgaaninen haitta-aine.
ppb	<i>Parts Per Billion</i> . Miljardisosa. Esimerkiksi µg/kg tai ng/g.
SAC	<i>Saccharin</i> . Sakariini.
SCL	<i>Sucralose</i> . Sukraloosi.
SDB	<i>Styrene Divinyl Benzene</i> . J. T. Bakerin adsorbenttimateriaali.
S/N	<i>Signal to Noise Ratio</i> . Signaali-kohinasuhde.
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> . Kiinteäfaasiuutto.
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> . Ohutkerroskromatografia.
TOF	<i>Time Of Flight</i> . Lentoaikamassaspektrometria.
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> . Watersin [®] kehittämä erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiateknikka.
UV/VIS	<i>Ultraviolet/Visible light</i> . Ultraviolettivalo/näkyvä valo.
WAX	<i>Weak Anion-eXchange</i> . Watersin [®] adsorbenttimateriaali.

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) Tutkimus- ja innovaatioyksikön Hakuninmaan laboratoriossa Helsingissä kevään ja kesän 2010 aikana. SYKE:n Tutkimus- ja innovaatiolaboratorion yksi keskeisimmistä erityisosaamisen alueista on orgaanisten yhdisteiden ympäristöanalytiikka, jota myös tässä opinnäytetyössä raportoitava menetelmänkehitys edustaa. Laboratorio on erikoistunut hyvin pienten pitoisuuksien mittaamiseen: rutiinikäytössä olevien analyysimenetelmien määrittämisrajat ovat yleisesti ppb- eli jäämätason pitoisuuksia.

Tarve kehittää ympäristönäytteille sopiva keinotekoisien makeutusaineiden määrittämenetelmä on seurausta siitä, että näiden elintarvikkeissa yleisten synteettisten molekyylien on epäilty haittaavan varsinkin vesiekosysteemin luonnonmukaista toimintaa. Arvioita makeutusaineiden potentiaalisista ympäristöhaitoista on viime vuosina esitetty useissa alan tieteellisissä julkaisuissa.

Ympäristönäytteille soveltuvia keinotekoisien makeutusaineiden analyysimenetelmiä on maailmalla tähän mennessä raportoitu muutamia Euroopasta ja yksi Yhdysvalloista. Pohjoismaisista ympäristötutkimuslaitoksista makeutusainetutkimusta on tehty Ruotsissa sekä Norjassa ja tämän opinnäytetyön myötä nyt myös Suomessa. Useimmiten huomion kohteena on kuitenkin ollut vain yksi makeutusaine – sukraloosi. Tässä opinnäytetyössä menetelmään sisällytettiin kaikkiaan neljä keinotekoista makeutusainetta: asesulfaami-K, sakariini, syklamaatti ja sukraloosi.

2 KEINOTEKOISET MAKEUTUSAINEET JA YMPÄRISTÖ

Kehitettävään menetelmään sisällytettävistä keinotekoisista makeutusaineista asesulfaami-K, sakariini ja sukraloosi ovat laillistettuja elintarvikkeiden lisäaineita EU:ssa, USA:ssa ja ylipäätään laajalti ympäri maailman. Analyysteista syklamaatti puolestaan on sallittu EU:ssa, mutta USA:ssa sen käyttö elintarvikkeissa on tällä hetkellä kielletty.

Keinotekoisien makeutusaineiden käytön lisääntyessä myös niiden mahdollisista haitoista on huolestuttu. Viime vuosikymmeninä on käyty vilkasta tieteellistä sekä populaaria keskustelua elintarvikkeissa yleisesti käytettyjen lisäaineiden riskeistä ja mahdollisista terveyshaitoista. Erityisesti on epäilty makeutusaineiden ja erityyppisten syöpäsairauksien välistä yhteyttä, jota ei kuitenkaan kiistattomasti ole pystytty osoittamaan.

Päähuomio eurooppalaisessa ja varsinkin pohjoismaisessa makeutusainekeskustelussa on siirtynyt terveysvaikutuksista näiden synteettisten molekyylien ekologiin vaikutuksiin. Ympäristöselvityksiä ei USA:ssa eikä EU:ssa laillistuksen yhteydessä pidetty tarpeellisina, koska muut tutkimukset olivat jo riittävällä varmuudella osoittaneet, että keinotekoiset makeutusaineet eivät ole luonteeltaan toksisia tai biokertyviä – ainakaan elintarvikekäytössä olevissa pitoisuuksissa. EU:ssa kuitenkin harkitaan, tulisiko uusien markkinoille pyrkivien makeutusaineiden ympäristötestausvaatimuksia tiukentaa. [1.]

2.1 Pysyvyys ja päätyminen ympäristöön

Kevyttuotteissa keinotekoisia makeutusaineita käytetään lisäaineina sen vuoksi, että ruokaan tai juomaan saataisiin sokerin kaltainen makea maku. Elimistöön niistä ei kuitenkaan kerry energiaa toisin kuin hiilihydraateista. Koska ihminen ei juurikaan pysty metaboloimaan näitä molekyyliä, ne kulkeutuvat elimistön läpi pilkkoutumatta ja päätyvät lopulta jätevesiin alkuperäisen rakenteensa mukaisessa muodossa.

Jätevedenpuhdistamojen influenttien (laitokseen tuleva, puhdistamaton jätevesi) ja effluenttien (laitoksesta vesistöihin poistuva, puhdistettu jätevesi) välillä tehdyt vertailututkimukset ovat luotettavasti osoittaneet, että suurin osa kuluttajilta jätevesiin päätyvistä keinotekoisista makeutusaineista kulkeutuu sellaisenaan puhdistusprosessin läpi vesistöihin [2; 3; 4]. Tämän seurauksena kansainvälisessä tieteellisessä keskustelussa on monelta taholta tuotu

julki huoli vesiympäristöön kertyvien makeutusaineiden biologisista vaikutuksista.

Ydinongelmana makeutusaineiden päätyemisessä ympäristöön on niiden hyvä säilyvyys. Useimmat yhdisteistä ovat kemiallisesti varsin stabiileja monenlaisissa vesiympäristöissä. Koska kyse on synteettisesti valmistetuista molekyyleistä, mahdollista on, että ympäristössä ei luontaisesti esiinny eliöitä, jotka pystyisivät hajottamaan keinotekoisia makeutusaineita. Sukraloosin kohdalla tosin joitakin teorioita ainakin osittaisesta biohajoavuudesta on esitetty [17]. Kuitenkaan täyttä yksimielisyyttä asiassa ei vielä ole saavutettu [3, s. 81].

Pintavesikartoituksissa löydetty makeutusainepitoisuudet osoittavat, että hajoaminen ympäristössä ei tapahdu kovin nopeasti. Esimerkiksi sukraloosin säilyvyys vesistöissä on arvioitu 5–10 vuotta [3, s. 19]. Pitkä säilyvyys tekee makeutusaineiden jatkuvasta vesistöihin kertymisestä huolestuttavaa. Jos pitoisuudet vuosi vuodelta kasvavat eksponentiaalisesti, voi myös pohdita, onko tulevaisuudessa enää mahdollista toimittaa kuluttajille sellaista juomavettä, joka ei jo valmiiksi sisältäisi keinotekoisia makeutusaineita [9, s. 29].

Elintarvikekulutuksen nykyisten trendien nojalla voidaan olettaa, että keinomakeutusaineita sisältävien kevyttuotteiden käyttö ei ole tulevaisuudessa ainakaan vähenemään päin vaan pikemminkin päinvastoin. Ympäristökertymiseen liittyvä ongelma piilee varsinkin tiheästi asuttujen alueiden läheisissä vesistöissä, joihin suuret jätevedenpuhdistamot laskevat puhdistusprosessin läpi käyneen aineksen.

2.2 Vaikutukset ekosysteemissä ja ympäristöstä löydetty pitoisuudet

Keinotekkoisten makeutusaineiden ympäristövaikutuksista ei ole vielä saatavilla riittävästi tutkimustietoa. Tällä hetkellä ei pystytä varmuudella arvioimaan, onko makeutuvasta vesiekosysteemistä kehittymässä merkittävä ympäristöriski. Epäilyihin ympäristöhaittoihin liittyviä tutkimusprojekteja on kuitenkin suunnitteilla. Haastavaa asiassa on muun muassa se, että ei ole olemassa valmiita testimenetelmiä, jotka sellaisenaan olisivat sovellettavissa makeutusaineiden ekosysteemissä aiheuttamien vaikutusten havainnointiin [1]. Pelkän toksisuuden tai biokertyvyyden sijaan makeutusaineiden biovaikutusten tutkimuksessa huomion kohteena tulisi olla vesiekosysteemin toi-

minta kokonaisuudessaan. Tällöin tarkasteltaisiin muun muassa eläinten ja eliöiden käyttäytymistä, vuorovaikutussuhteita sekä niihin kohdistuvaa stressiä. Kokonaisvaltaiseen ekologiseen tarkasteluun tulisi sisällyttää eläinten lisäksi myös kasvit ja niiden joukossa erityisesti vesiympäristön levät.

Ruotsissa kriittistä keskustelua on herättänyt varsinkin se, että markkinoille on hyväksytty sukraloosin kaltainen makeutusaine, joka perusrakenteeltaan on kloorattu hiilivety, kuten esimerkiksi pahamaineiset DDT ja PCB [8, s. 2, 7–8; 9, s. 28–31]. Ruotsalaisessa mediassa käytyyn sukraloosikeskusteluun ovat osallistuneet aktiivisesti sekä tutkijat että tavalliset kansalaiset [esim. 10; 11; 12]. Kannanotoissa on muun muassa pohdittu, tulisiko sukraloosi virallisesti luokitella ympäristössä erityisen pitkään säilyväksi orgaaniseksi haitta-aineeksi eli POP-yhdisteeksi (*Persistent Organic Pollutant*).

Vesistöihin kertyvät keinotekoiset makeutusaineet saattavat muuttaa vesiekosysteemin toimintaa. Esimerkiksi vesieläinten tietyt makuaistimuksin ohjatut toiminnot, kuten kalojen ravinnon etsiminen, suunnistus ja pariutuminen, voivat häiriintyä. Makeutusaineista erityisesti sukraloosin on epäilty vesieläimistön lisäksi olevan haitallista myös kasveille ja tietyille symbioottisille suhteille, joissa kasvit ovat osallisena. Eräässä tutkimuksessa osoitettiin, että sukraloosin läsnäolo haittaa sakkaroosin kuljetusta sokeriruo'ossa. Tämän perusteella on arveltu, että se saattaisi häiritä sokerin kuljetusta lehdistä juuriin myös muissa kasveissa. Esiin on tuotu myös mahdollisuus, että sukraloosi häiritsisi jopa fotosynteesiä, mikä todeksi osoittautuessaan tarkoittaisi muun muassa sitä, että vesistöjen levät eivät suurissa sukraloosipitoisuuksissa enää niin tehokkaasti pystyisi sitomaan hiilidioksidia ja vapauttamaan happea. [1; 5; 6; 7; 8, s. 5–6; 16.]

Vaikka puhdistettujen jätevesien mukana luontoon päätyvien makeutusaineiden vaikutuksia ei vielä riittävästi ole tutkittu, on muutamissa ruotsalais-tutkimuksissa jonkin verran kiinnitetty huomiota biologiseen näkökulmaan. Vuonna 2008 selvitettiin, onko Tukholman ja Linköpingin vesialueilta pyydytettujen kalojen ja simpukoiden kudoksiin kertynyt sukraloosia. Toteamisrajan ylittäviä pitoisuuksia ei tutkituista lihas- ja maksakudoksista löydetty [13, s. 14]. Nämä eläinkudoksesta saadut tulokset olivat odotetun mukaisia, sillä jo aiemmin on osoitettu, että keinotekoiset makeutusaineet eivät ole bioker-tyviä, mikä suurimmilta osin lienee niiden vesiliukoisuuden ansiota.

Pelkkä eläinkudosten tai muiden ympäristöstä peräisin olevien erityyppisten näytteiden pitoisuuksiin kohdistuva tutkimus ei anna riittävästi informaatiota ekosysteemiin kohdistuvista riskeistä. Kokeellisilla vaikutustesteillä tulisi selvittää, millainen stressitekijä vuosi vuodelta makeammaksi muuttuva ympäristö on vesistöjen eläin- ja kasvilajistolle. Tähän tarpeeseen viimeisimpänä on pyrkinyt vastaamaan vuonna 2009 julkaistu Tukholman yliopiston tutkimus, jossa kahdelle äyriäislajille toteutettiin altistuskokeita eri sukraloosipitoisuuksissa. Nämäkin tulokset osoittivat, ettei sukraloosi kerry eliöihin. [15.]

Eri sukraloosipitoisuuksille altistuneiden äyriäisyksilöiden välillä kuitenkin havaittiin eroja. Tutkijoiden mukaan yksi trendeistä oli eliöiden RNA-sisällön lisääntyminen ympäristön sukraloosipitoisuuden kasvaessa, mikä saattaa viitata stressiperäisten reaktioiden käynnistymiseen. Lisäksi erityisesti nuorilla leväkatkoilla havaittiin lisääntyntä kuolleisuutta sukraloosipitoisuuden kohotessa. Esitetyt tulokset olivat kuitenkin vasta alustavia. Aineistosta tulkitut trendit olivat vielä monin tavoin kyseenalaistettavissa. Tutkimuksen tekijöillä oli suunnitteilla lisäkokeita, joista raportoitaisiin vuoden 2010 loppupuolella. Jatkotutkimusten tavoitteeksi ilmoitettiin myös perehtyminen siihen, vaikuttaako sukraloosi jollain tavoin eliöiden signaalijärjestelmiin. [15; 16.]

Ruotsin ja Norjan ympäristölaitokset toteuttivat vuonna 2007 yhteistyössä kartoitukset, joiden tulokset osoittivat, että kummankin maan jäte-, pintavesi- ja lietenäytteistä oli löydettävissä vaihtelevat pitoisuudet sukraloosia. Norjalaisessa tutkimuksessa sukraloosin ohella kartoituksen kohteena oli myös fosforoituja palonestoaineita sekä polyfluorattuja yhdisteitä. [2; 3.]

Ruotsalaisten vedenpuhdistamojen prosessoimien effluenttien keskimääräiseksi sukraloosipitoisuudeksi mitattiin 4–5 µg/l. Norjassa päädyttiin kutakuinkin samaan tulokseen. Pitoisuuksien on arvioitu toistaiseksi olevan vielä niin matalat, että välittömiä toksisia ympäristövaikutuksia ei nykyisellä tasolla ole odotettavissa. Jos väestön tuottama makeutusainekuormitus tulevaisuudessa säilyy vähintään samalla tasolla, arvioitiin sukraloosia stabiiliutensa ansiosta kertyvän vesistöihin vuosien kuluessa pitoisuus, joka pitkällä tähtäimellä saattaa muodostua merkittäväksi ympäristöriskiksi. [2, s. 19; 3, s. 80; 13, s. 15; 14, s. 10.]

Norjassa toteutettiin vuonna 2009 kartoitus, jossa sukraloosi edelleen oli mukana uusien orgaanisten haitta-aineiden joukossa. Tällä kertaa huomion

kohteena oli suurien asutuskeskusten sijaan arktinen alue, jossa väestömäärä sekä siten myös ympäristön jätevesikuormitus on hyvin alhainen. Sukraloosia etsittiin Huippuvuorten rannikolta otetuista merivesinäytteistä. Näytteistä ei löydetty detektiorajan ylittäviä pitoisuuksia. Aiemman kartoituksen merivesinäytteet oli otettu Etelä-Norjasta vesialueilta, jotka ovat lähellä suuria asutuskeskuksia ja joille jätevedenpuhdistamot laskevat effluenttinsa. Merivedestä mitatut sukraloosipitoisuudet olivat näissä näytteissä korkeimmillaan luokkaa 30 ng/l. [3, s. 81–82; 14, s. 23.]

Vaikka sukraloosista USA:ssakin Euroopan tavoin käydään ajoittain kriittistä keskustelua, mahdollisten ympäristövaikutusten tutkimus ei siellä ole herättänyt suurta kiinnostusta sen jälkeen, kun kemikaalialalla ympäri maailman korkealle arvostettu auktoriteetti FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) antoi sukraloosista hyväksyvän lausunnon. FDA:n päätöksessä ympäristövaikutusten tutkimatta jättäminen perusteltiin kokonaisuudessaan seuraavasti:

The agency has carefully considered the potential environmental effects of this action. FDA has concluded that the action will not have a significant impact on the human environment, and that an environmental impact statement is not required¹. [26, s. 4.]

Ympäristövaikutustutkimusten sivuuttamisesta huolimatta USA:ssa on toteutettu vuonna 2009 jäte- ja meriveteen kohdistunut sukraloosin pitoisuuskartoitus. Effluenteista tuolloin löydetty korkein pitoisuus oli noin 120 µg/l. Eurooppalaisista effluenteista tähän mennessä raportoidut korkeimmat sukraloosipitoisuudet ovat olleet luokkaa 10 µg/l. Myös pintavesimatriisista saatiin USA:ssa selvästi korkeampia pitoisuuksia kuin Euroopassa: merivesinäyte Keski-Floridan alueelta sisälsi sukraloosia lähes 2 µg/l. Merivesinäytteitä otettiin myös kauempaa rannikosta Golf-virran vaikutusalueelta ja myös niistä löydettiin määritysrajan ylittäviä pitoisuuksia. Avomerinäytteistä saadut tulokset osoittivat, että USA:n itärannikolta mereen päätyvät, vesiympäristössä pitkään säilyvät synteettiset yhdisteet mitä todennäköisimmin leviävät Golf-virran mukana Länsi- ja Pohjois-Euroopan rannikkovesiin ja viime kädessä globaalisti kaikkiin meriympäristöihin. [2; 18; 33.]

Amerikkalaisia ja eurooppalaisia tuloksia vertailtaessa on kuitenkin otettava huomioon muun muassa se, että ne on mitattu eri tekniikoilla: USA:n tutkimuksessa on laitetekniikkana ollut GC-MS, kun taas useimmissa eurooppa-

¹ Sitaattia ei ole suomennettu, jotta sanomaa ei muutettaisi liikaa alkuperäiseen versioon nähden.

laisissa tutkimuksissa se on ollut LC-MS/MS, jota spesifisyytensä nojalla pidetään tällä hetkellä yhtenä ympäristönäytteiden makeutusaineanalytiikkaan parhaiten soveltuvista menetelmistä.

Vuonna 2009 raportoitu koko EU-alueen laajuinen sukraloosin ympäristökartoitus osoitti, että suurin sukraloosikuormitus EU:n alueella on tällä hetkellä keskittynyt Länsi-Euroopan ja eteläisen Skandinavian pintavesiin. Kaikkein korkein sukraloosipitoisuus, lähes 1 µg/l, mitattiin Ison-Britannian Severn-joesta. Tämä on kuitenkin vain puolet edellä mainitusta USA:ssa raportoidusta korkeimmasta pitoisuudesta. Pintavedestä löydettyinä näitä pitoisuuksia voidaan pitää huomattavan korkeina, koska Ruotsissa ja Norjassa vain effluenteista mitatut pitoisuudet ylsivät samalle tasolle. [2; 3; 31.]

2.3 Makeutusaineiden hyödyntäminen vesistötutkimuksissa

Sveitsiläisen pitoisuuskartoituksen yhteydessä vuonna 2009 oivallettiin, että keinotekoisien makeutusaineiden vesiympäristöön leviämisessä on nähtävissä myös vesistökontaminaatioiden arviointiin liittyvä sovelluskohde. Saatujen tutkimustulosten perusteella ehdotettiin, että keinotekoisista makeutusaineista erityisesti asesulfaami olisi ideaali kemiallinen molekyyli-markkeri, jonka avulla voitaisiin seurata, missä määrin pinta- ja pohjavedet ovat päässeet kosketuksiin jäteveden kanssa. [18.]

Koska asesulfaami valmistetaan synteettisesti, luonnosta löydettävät pitoisuudet ovat lähtöisin kotitalouksien jätevesistä. Keinotekoisilla makeutusaineilla ei tietyvästi ole käyttöä maanviljelyksessä eikä muulla teollisuuden alalla kuin elintarviketeollisuudessa. Sveitsiläisessä tutkimuksessa havaittiin, että asesulfaami molekyylinä on riittävän stabiili ja hydrofiilinen, jotta sen on helppo pintavesien kautta kulkeutua pohjavesiin. Asesulfaamin kohdalla myös määrittäminen oli helppoa saada pinta- ja pohjavesien kannalta riittävän matalaksi ilman, että esikäsittelystä tulee liian monivaiheinen. [18, s. 4384.]

Yhdysvaltalaisen merivesitutkimuksen yhteydessä on esitetty samansuuntainen ajatus makeutusaineiden toimimisesta eräänlaisina kemiallisina jäljitteinä ihmisen tuottamalle ympäristökuormitukselle. Tässä yhteydessä sukraloosia ehdotettiin markkeriksi, jonka avulla voitaisiin saada tietoa synteettisten yhdisteiden leviämisen ja merivirtojen liikkeiden välisistä yhteyksistä jopa globaalilla tasolla. [33, s. 17.]

3 KATSAUS KEINOTEKOISTEN MAKEUTUSAINEIDEN ANALYTIikkaan

Eri tekniikoihin perustuvia keinotekoisien makeutusaineiden elintarvikeanalytiikkaan soveltuvia menetelmiä on laboratorioissa ympäri maailman ollut käytössä jo vuosikymmenien ajan. Ruoille ja juomille kehitetyistä makeutusaineiden analyysimenetelmistä voi saada hyviä vinkkejä myös ympäristöanalyttisen menetelmän kehitykseen. Kuitenkaan niitä ei sellaisinaan voi soveltaa ympäristönäytteisiin, koska ympäristöstä löydettävissä olevat pitoisuudet ovat vähintään tuhat ja useimmiten jopa miljoona kertaa pienempiä kuin elintarvikkeissa. Tavanomainen elintarvikkeen makeutusainepitoisuus on tasoa mg/kg, kun ympäristönäytteiden kohdalla määritettävät pitoisuudet pääsääntöisesti edustavat tasoa µg/kg–ng/kg.

Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että suurten asutuskeskusten effluenttien (puhdistettu jätevesi) makeutusainepitoisuudet ovat tyypillisesti tasolla µg/l. Pintavesien kohdalla määräysrajoissa tulisi päästä vielä alemmaksi, tasolle ng/l. Keskeisimpinä tekijöinä jäämätason saavuttamiseen ympäristöanalyttisissä menetelmissä ovat näytteen konsentrointi sekä riittävän herkkä ja spesifinen laitetekniikka.

Elintarvikkeiden makeutusainemäärityksissä on viime vuosikymmeninä käytetty laitetekniikoina esimerkiksi ionikromatografiaa (IC), kapillaarielektroforeesia (CE) ja erilaisia elektrokemiallisia menetelmiä. Tyypillinen tekniikka on ollut myös UV/VIS-spektrofotometria sekä sellaisenaan että yhdistettynä korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan (HPLC). Kaasukromatografisia (GC) sovelluksia on kehitetty, mutta ne eivät missään vaiheessa ole saaneet kovin suurta suosiota. Makeutusaineiden heikon haihtuvuuden vuoksi GC-analyysia varten analyytit on derivatisoitava helpommin haihtuvaan muotoon, mikä usein mielletään työlääksi, aikaa vieväksi ja lopputulokseen lukuisia epävarmuustekijöitä tuottavaksi työvaiheeksi. Kromatografisista tekniikoista on hyödynnetty myös ohutkerroskromatografiaa (TLC). Lisäksi käytössä on ollut entsyymaattisiin reaktioihin perustuvia menetelmiä. [32.]

Massaspektrometrinen (MS) tekniikoiden kehittyminen ja laitteistojen saatavuuden parantuminen viimeksi kuluneella vuosikymmenellä on vaikuttanut siihen, että monessa laboratoriossa nestekromatografi-massaspektrometrimenetelmät ovat syrjäyttäneet perinteiset nestekromatografiset menetelmät, joissa detektio tyypillisimmillään on perustunut UV/VIS-valoabsorptioon.

Tandemmassaspektrometrian (MS/MS) yleistyminen on kasvattanut massaspektrometrinen tekniikoiden suosiota orgaanisessa ympäristöanalytiikassa, jossa tutkittava matriisi yleensä sisältää monia häiriötekijöitä ja mitattavat pitoisuudet ovat hyvin pieniä. Tällöin detektiotekniikan tulee olla mahdollisimman herkkä ja spesifinen. Näiden vaatimusten kannalta MS/MS:n suorituskykyä pidetään varsin hyvänä.

Kun laitetekniikan valinnassa otetaan huomioon, että keinotekoisia makeutusaineita ei ilman derivatisointia ole kovinkaan helppoa saada haihtumaan, on tyypillisin laitteistovalinta tähän mennessä kehitettyihin ympäristöanalyttisiin menetelmiin ollut HPLC-MS/MS [4; 18; 31]. Ruotsin ja Norjan ympäristölaitokset ovat tehneet yhteistyötä menetelmiensä kehityksessä, ja kummankin maan kartoitukset on toteutettu kaikkia yksityiskohtia myöten samalla menetelmällä [2; 3; 13; 14]. Kyseessä on tiettävästi ensimmäinen makeutusaineanalytiikan sovellus, jossa hyödynnetään myös korkean erotuskyvyn lentoaikamassaspektrometriaa (TOF, *Time Of Flight*).

Ensimmäisessä yhdysvaltalaisessa makeutusaineiden ympäristökartoituksessa mitattiin sukraloosia menetelmällä, joka on ainoa raportoitu makeutusaineiden ympäristöanalyttinen GC-MS-sovellus [33]. Yhdysvalloissa on vuonna 2008 kehitetty makeutusainemenetelmä samalla laitetekniikalla kuin tässä opinnäytteessä [34]. Tuota UPLC-MS/MS-menetelmää ei kuitenkaan voitu käyttää esikuvana kehitystyölle, koska analyttinä oli vain syklimaatti ja näytematriisina elintarvikkeet.

Tässä opinnäytteessä kehitetylle menetelmälle tärkeimpänä lähtökohtana toimi vuonna 2009 raportoitu saksalainen jäte- ja pintavesikartoitus, jossa analyysitekniikkana oli HPLC-MS/MS ja määrittämisen kohteena seitsemän keinotekoista makeusainetta mukaan lukien kaikki tämän työn analyytit [4]. Toisen hyödyllisen vertailukohdan tarjosi vuoden 2009 sveitsiläinen ympäristönäytteiden HPLC-MS/MS-tutkimus, jossa kohdeyhdisteet olivat samat kuin SYKE:een kehitetyssä menetelmässä [18]. Nämä kaksi menetelmää ovat ainoat tähän mennessä raportoidut makeutusaineiden ympäristöanalyttiset sovellukset, joissa analyyttejä on enemmän kuin yksi. Ympäristöanalyttisiä sukraloosimenetelmiä on maailmalla kehitetty useita, ja niiden kesken on toteutettu myös kansainvälinen pätevyyskoe [19].

4 MÄÄRITETTÄVÄT ANALYYTIT

Asesulfaami-K (ACS), sakariini (SAC) ja sykramaatti (CYC) ovat kemiallisen rakenteensa kannalta melko samantyyppisiä. Ne kaikki ovat olleet käytössä pitkään, joten ne voidaan luokitella vanhan polven keinotekoisiksi makeutusaineiksi. Sukraloosi (SCL) puolestaan on sekä rakenteensa että syntetisöimisajankohtansa perusteella uuden polven keinotekoinen makeutusaine.

Kohdeyhdisteiden valintakriteerinä oli, että niiden tulee olla rakenteeltaan stabiileja ja niitä tulee esiintyä Suomessa myytävissä elintarvikkeissa. Suomalaisissa kevyttuotteissa yleistä aspartaamia ei otettu mukaan menetelmään, koska se hajoaa helposti lämmön vaikutuksesta ja nesteisiin joutessaan [4, s. 1586]. Toisin kuin useimmat keinotekoiset makeutusaineet aspartaami hajoaa ihmiselimistössä ja kulkeutuu jätevesiin asparagiinihappo- ja fenyylialaniinimetaboliitteina.

4.1 Asesulfaami-K

Menetelmään valittujen neljän analyytin joukossa asesulfaami-K on kaikkein yleisin lisäaine suomalaisissa kevytelintarvikkeissa. Se on ollut käytössä pitkään ja on makeutusaineista turvallisimmaksi mielletty. Tyypillisimmillään se esiintyy yhdessä aspartaamin kanssa, koska yhdistelmän makeaa makua pidetään erityisen laadukkaana [20]. Tämä yhdistelmä on käytössä monessa suomalaisten kuluttajien suosittuotteessa (esimerkiksi Pepsi Max[®] ja Coca-Cola Zero[®] sekä lukuisat kevytjugurtit).

Useimmat keinotekoisista makeutusaineista on keksitty muun syntetiikan ohessa ilman, että niitä on päämäärätietoisesti lähdetty kehittämään. Näin tapahtui myös vuonna 1967, kun asesulfaami-K:n makeus sattumalta huomattiin. Molekyyli on hyvin stabiili ja varsinkin termisesti erityisen kestävä. Maultaan asesulfaami-K on noin 130–200 kertaa makeampaa kuin tavallinen pöytäsookeri eli sakkaroosi. [20.]

4.2 Sakariini

Sakariini keksittiin vuonna 1879, se on tunnetuista keinotekoisista makeutusaineista vanhin. Sen käyttö yleistyi massiivisesti erityisesti maailmansotien aikana, kun sakkaroosia oli niukasti saatavilla. Sakariinilla on pitkä historia myös suomalaisissa elintarvikkeissa. Nykyisin sitä käytetään enää har-

voissa tuotteissa. Suomessa tunnetuin ja edelleen yleisesti käytetty sakariinia sisältävä tuoteryhmä on Hermesetas-nimellä myytävät makeutusjauheet ja -tabletit. [20; 21.]

Maultaan sakariini on noin 300–500 kertaa makeampaa kuin sakkaroosi. Suomessa terveysviranomaiset eivät suosittele sakariinin käyttöä raskauden aikana, vaikka kohtuukäytön haittoja ei olekaan pätevästi pystytty osoittamaan. [22.]

4.3 Syklamaatti

Syklamaatti syntetisoitiin ensimmäisen kerran vuonna 1937. Se on tällä hetkellä käyttökiellossa USA:ssa. Syklamaatti on sukraloosin jälkeen uusin keinotekoinen makeutusaine Suomen markkinoilla: se tuli lailliseksi vasta EU-jäsenyyden myötä vuonna 1995. Syklamaatti on 30–40 kertaa sakkaroosia makeampaa. Sakariinin ohella se on toinen makeutusaine, jota viranomaiset suosittelevat välttämään raskauden aikana. [20; 22.]

Kotimaiset valmistajat eivät edelleenkään suosi syklamaattia tuotteissaan. Se on löytänyt tiensä Suomeen ulkomailta tuotujen elintarvikkeiden lisäaineena. Syklamaatti on yleinen ainesosa ulkomaisissa virvoitusjuomissa ja mehuissa (esimerkiksi saksalaisen Lidlin Freeway Cola Light). Vuonna 2009 raportoidun jäte- ja pintavesikartoituksen tulokset viittasivat siihen, että syklamaatin käyttö on varsin yleistä Saksassa, vaikka monissa muissa Euroopan maissa sitä ei juurikaan enää käytetä [4, s. 1591–1592].

4.4 Sukraloosi

Vuonna 1976 keksitty sukraloosi on SYKE:n menetelmään sisällytettävistä yhdisteistä kaikkein uusin. Se on monilta ominaisuuksiltaan täysin erilainen kuin aiemmat makeutusaineet. Kemialliselta rakenteeltaan sukraloosi on kloorattu hiilivety, kun taas muissa menetelmään sisällytettävissä hiilivedyissä heteroatomeina esiintyy typpeä, happea ja rikkiä. Makuominaisuuksiltaan sukraloosi on hyvin intensiivinen, peräti 600 kertaa sakkaroosia makeampi, eikä se jätä jälkeensä perinteisille makeutusaineille ominaista metallista jälkimakua [23, s. 1].

Sukraloosi valmistetaan sakkaroosista viisivaiheisella selektiivisellä substitutiolla, jossa lähtöainemolekyylin kolme hydroksyyli ryhmää korvataan klooriatomeilla. Tuloksena saadaan yhdiste, joka on hyvin stabiili eri lämpötiloissa ja laajalla pH-alueella. Kloorauksesta huolimatta sukraloosi on enemmän hydrofiilinen kuin lipofiilinen molekyyli viiden hydroksyyli ryhmänsä ansiosta. [23, s. 1–2.]

Sukraloosi on jo sen historian alusta lähtien ollut elintarvikkeissa kiistanalainen lisäaine, koska monet klooratut yhdisteet ovat tunnettuja ympäristömyrkkyjä. Stabiiliutensa ja vesiliukoisuutensa vuoksi sillä ei ole samanlaisia vaikutuksia kuin toksisilla klooriyhdisteillä, jotka yleensä ovat rasvaliukoisia ja hyvin reaktiivisia. [8; 23, s. 1.]

Ensimmäisenä sukraloosi hyväksyttiin elintarvikekäyttöön Kanadassa vuonna 1991. USA:ssa se laillistettiin vuonna 1998 ja EU:ssa sekä siten myös Suomessa vasta vuonna 2004. Stabiiliutensa ja makuominaisuuksiensa vuoksi sitä ryhdyttiin käyttämään kalorittomana makeutusaineena hyvin monissa erityyppisissä elintarvikkeissa, muun muassa juomissa, leivonnaisissa, makeisissa ja maitotuotteissa. Lisäksi sitä on monissa maissa saatavilla sellaisenaan tuotenimellä Splenda®. Pohjois-Amerikassa sukraloosin käyttö on 2000-luvun aikana kasvanut räjähdysmäisesti. Valmistajan mukaan USA:ssa on saatavilla tällä hetkellä 1 700 erilaista sukraloosia sisältävää elintarviketta. Suosiossa se on syrjäyttänyt monen perinteisen makeutusaineen aseman. [24; 25.]

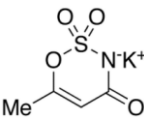
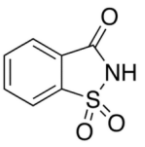
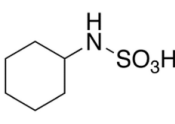
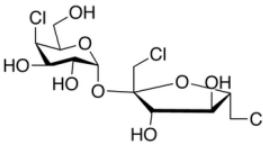
Koska sukraloosi hyväksyttiin Euroopassa vasta vuonna 2004, se ei täällä ole vielä yhtä yleisessä käytössä kuin Pohjois-Amerikassa. Viime vuosina se kuitenkin on alkanut yleistyä erityisesti Länsi- ja Pohjois-Euroopan markkinoilla. Ruotsissa sukraloosi on jo paljon tunnetumpi kuin Suomessa. Todennäköisesti sen käyttö myös Suomessa lähivuosina lisääntyy.

5 MATERIAALIT JA LAITTEISTOT

5.1 Standardireagenssit

Taulukkoon 1 on koottu menetelmänkehityksessä käytetyt keinotekoisien makeutusaineiden natiivimuotoiset standardit tunnistetietoineen ja keskeisimpien ominaisuuksineen. Tiedot on koostettu useammasta lähteestä, pääosin reagenssien mukana toimitetuista analyysitodistuksista [35–43].

Taulukko 1. Natiivimuotoiset makeutusainestandardit

Suomen-kielinen nimi	Asesulfaami-K	Sakariini	Syklaami-happo ²	Sukraloosi
Englannin-kielinen nimi	Acesulfame Potassium	Saccharin	Cyclamic Acid	Sucralose
Lyhenne	ACS	SAC	CYC	SCL
CAS-numero	55589-62-3	81-07-2	100-88-9	56038-13-2
E-koodi ³	E950	E954	E952	E955
Valmistaja	TRC ⁴	Ehrenstorfer ⁵	TRC	TRC
Eränumero	3-YFD-18-1	70105	21-SSR-4-1	TRC-20040727
Puhtaus	98 %	99 %	98 %	98 %
Rakenne				
Moolimassa	201,24 g/mol	183,19 g/mol	179,24 g/mol	397,64 g/mol
Sulamispiste	> 250 °C	224–227 °C	204–206 °C	130–132 °C
pK _a -arvo	~ 2,0	~ 1,6	~ 1,9	–
H ₂ O-liukoisuus	270 g/l	3,5 g/l	liukenee	283 g/l
MeOH-liukoisuus	10 g/l	~ 32 g/l	liukenee	liukenee
ADI ⁶ -arvo	9 mg/kg/vrk	3,8 mg/kg/vrk	7 mg/kg/vrk	15 mg/kg/vrk

² CYC:sta yleensä käytetään suolamuodon mukaista nimitystä sykramaatti, standardina tässä menetelmässä kuitenkin käytettiin saman yhdisteen happomuotoa eli syklaamihappoa.

³ E-koodi = EU:n alueella hyväksytyn elintarvikelisäaineen tunnusnumero. Tuotepakkauksissa tulee aina olla merkittynä joko E-koodi tai lisäaineen koko nimi.

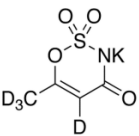
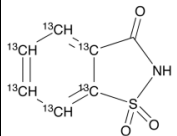
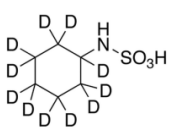
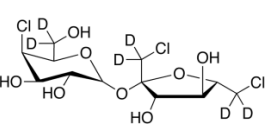
⁴ TRC = Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Ontario, Kanada).

⁵ Ehrenstorfer = Dr. Ehrenstorfer-Schäfers (Augsburg, Saksa).

⁶ ADI = Acceptable Daily Intake, päivittäinen saanti, jota ei suositella ylitettävän; ilmoitetut lukuarvot edustavat tällä hetkellä voimassa olevia EU-suosituksia [27; 28; 29; 30].

Taulukkoon 2 on koottu tunnistetiedot menetelmänkehityksessä hyödynne-
tyistä massaleimatuista standardeista.

Taulukko 2. Massaleimatut makeutusainestandardit

Suomen- kielinen nimi	Asesulfaami- d_4 -K	Sakariini- $^{13}\text{C}_6$	Syklaami- happo- d_{11}	Sukraloosi- d_6
Englannin- kielinen nimi	Acesulfame- d_4 Potassium	Saccharin- $^{13}\text{C}_6$	Cyclamic Acid- d_{11}	Sucralose- d_6
Lyhenne	d -ACS	^{13}C -SAC	d -CYC	d -SCL
Valmistaja	TRC	TRC	TRC	TRC
Eränumero	9-JHY-34-1	3-JLI-4-1	19-MJC-16-1	22-ANR-12-1
Puhtaus	98 %	98 %	98 %	96 %
Rakenne				
Moolimassa	205,27	189,14 g/mol	190,31 g/mol	403,67 g/mol
Sulamis piste	265–267 °C	219–221 °C	167–169 °C	75–79 °C

Isotooppileimatuista yhdisteistä ominaisuuksiltaan tarkimmin natiivimuotoa vastaa hiilileimattu standardi, jollainen oli saatavilla vain sakariinista. Muista analyyteistä saatavilla olivat deuteroidut versiot. Taulukon 2 rakennekaavoissa esitetään, kuinka massaleimatut elementit ovat sijoittuneet molekyyliin.

Kaikki standardireagenssit tilattiin valmistajilta kiinteässä olomuodossa. Laboratoriossa ne liuotettiin LC-MS-laatuiseen metanoliin siten, että kaikkien analyyttien pitoisuuksiksi natiivikantaliuoksissa tuli 1 g/l ja massaleimatuissa kantaliuoksissa 0,01 g/l. Valmiit kantaliuokset jaettiin eriin. Menetelmänkehityksessä tarvittu standardimäärä säilytettiin kylmiössä ja loput pakastimessa. Natiivimuotoisista standardeista laimennettiin metanoliin seos, jossa ACS:n, SAC:n ja CYC:n pitoisuus oli 10 000 ng/ml ja SCL:n pitoisuus 50 000 ng/ml.

Ppb-tason analytiikassa määritettävät pitoisuudet ovat niin pieniä, että kalibrointiin käytettävät liuokset tulee valmistaa gravimetrisesti. Tällöin standardiaineksen lisäksi myös liuotin punnitaan. Liuosten lopulliset pitoisuudet massakonsentraatioina (ng/ml) määritetään punnitustuloksista laskennallisesti liuotintihetyksien avulla vähintään kolmen desimaalin tarkkuudella.

5.2 Laitteistot

Tässä opinnäytetyössä toteutetussa menetelmänkehityksessä käytettiin seuraavia teknisiä laitteita. Keskeisimmistä laitteistoista on koottu kuvat liitteeseen 1.

UPLC-laitteisto

Acquity UPLC[®]: Acquity Binary Solvent Manager; Sample Manager; In-Line Degasser (Waters[®], Milford, MA, USA).

Esikolonne: VanGuard[™] BEH C18; partikkelikoko 1,7 µm (Waters[®], Milford, MA, USA).

Analyttinen kolonne: Acquity UPLC BEH C18, mitat 2,1 x 50,0 mm, partikkelikoko 1,7 µm (Waters[®], Milford, MA, USA).

MS/MS-laitteisto

Xevo[™] TQ MS (Waters[®], Milford, MA, USA).

UPLC-MS/MS-laitteiston ohjaus- ja datankäsittelyohjelmisto

MassLynx 4.1 (Waters[®], Milford, MA, USA).

Sentrifugaalihaidutin

Personal Evaporator EZ-Envi (GeneVac[®], Ipswich, UK).

Typpihaidutin

Sample Concentrator Dri Block[®] DB-3 (Techne, Staffordshire, UK).

pH-mittari

Sentron 2001 pH (RL Instruments, Manchaug, MA, USA).

Sentrifugi

Biofuge Pico (Heraeus, Hanau, Saksa).

5.3 Muut materiaalit

Menetelmänkehityksessä tarvittiin myös seuraavia materiaaleja.

SPE-patruunat

Bakerbond SDB 1; 200 mg/6 ml (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA).

Oasis[®] HLB; 200 mg/6 ml (Waters[®], Milford, MA, USA).

Oasis[®] WAX; 150 mg/6 ml (Waters[®], Milford, MA, USA).

Patruunoiden kanssa käytettiin vakuumpumppua sekä Watersin[®] lasista uuttokammiota.

Lasikuitusuodattimet

Glass Microfibre Filters GF/A; halkaisija 9,0 cm; huokoskoko 1,6 µm (Whatman, Maidstone, UK).

Suodatinten kanssa käytettiin vesisuihkupumppua sekä MilliporenTM imusuodatuslaitteistoa.

Ruiskusuodattimet

Phenex-RC; halkaisija 15,0 mm; huokoskoko 0,2 µm (Phenomenex[®], Torrance, California, USA).

Metanoli

Methanol LC-MS Chromasolv[®], puhtaus ≥ 99,9 % (Fluka Analytical–Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA).

Muurahaishappo

Formic Acid; puhtaus 98–100 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA).

Ammoniumasetaatti

Ammonium Acetate; puhtaus > 99,0 % (Fluka Analytical–Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA).

Ammoniumformaatti

Ammonium Formate Eluent Additive for LC-MS; puriss. p.a. (Fluka Analytical–Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA).

Ammoniakki

Ammonia Solution; puhtaus 25 % (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA).

Natriumkloridi

Sodium Chloride for Analysis EMSURE[®]; puhtaus ≥ 99,5 % (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA).

Heksaani

n-Hexane; puhtaus > 95 % (Fluka Analytical–Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA).

Laboratoriovesi

Milli-Q[®] A10; Millipak[®] 40 Sterile 0,22 µm (MilliporeTM, Billerica, MA, USA).

Tyypikaasu

MS/MS-laitteiston tyyppi: Maxigas-tyypigeneraattori; puhtaus > 98 % (Parker Domnick Hunter, Gateshead, UK).

Tyypihaihduttimen tyyppi: SR 5.0; puhtaus > 99,995 % (AGA, Espoo, Suomi).

6 KEHITETTYYN MENETELMÄÄN SISÄLTYVÄT TEKNIIKAT

6.1 Kiinteäfaasiuutto (SPE)

SPE (*Solid Phase Extraction*) eli kiinteäfaasiuutto on orgaanisessa analytiikassa viime vuosikymmenen aikana yleistynyt esikäsittelytekniikka. SPE:ssä käytettävä uuttopatruuna valitaan ominaisuuksiltaan sellaiseksi, että analysoitavat yhdisteet erottuvat näytetaustastaan tarttumalla kiinni kiinteään adsorbenttifaasin pintaan. Tavoitteena on erottaa määritettävät yhdisteet näytematriisista spesifisesti omaksi fraktiokseen niin, että mukana tulisi mahdollisimman vähän analyysiä häiritseviä ylimääräisiä taustakomponentteja. SPE-patruunan faasilla on siten samanlainen funktio kuin kromatografiakolonnin stationäärifaasilla. [44, s. 658–659.]

Sorbenttifaasiin adsorboituneet analyytit eluoidaan patruunasta liuottimella, jonka polaarisuus on valittu siten, että yhdisteet irtoavat faasista ja uuttuvat liuottimen mukana ulos patruunasta. Tyypillisimmillään SPE:ssä hyödynnetään käänteisfaasikromatografiaa. Tällöin sorbenttifaasina on melko pooliton materiaali, johon analyytit tarttuvat heikoilla, hydrofobiseen vuorovaikutukseen perustuvilla sidoksilla (van der Waalsin voimat). Toinen suosittu SPE:n faasityyppi on ioninvaihtosorbentti, jonka pinnalla tapahtuva adsorptio perustuu ionikromatografiaan.

Tämän opinnäytteen menetelmänkehityksessä kokeiltiin kahta käänteisfaasipatruunaa ja yhtä ioninvaihtopatruunaa. Käänteisfaasipatruunat olivat J.T. Bakerin Bakerbond SDB 1 (*Styrene Divinyl Benzene*) ja Watersin Oasis® HLB (*Hydrophilic-Lipophilic-Balanced*). Kumpikaan testatuista käänteisfaaseista ei ole luonteeltaan yhtä pooliton kuin pelkkä C18-faasi. Menetelmällä määritettävissä yhdisteissä on sen verran polaarisuutta, että testattaviksi käänteisfaasisorbenteiksi oli perusteltua valita sellaiset, joissa on mukana jonkin verran polaarisia elementtejä. Testattavana ioninvaihtopatruunana oli Watersin Oasis® WAX (*Weak Anion-eXchange*), jonka heikko anioninvaihtofaasi soveltuu hyvin varsinkin helposti ionisoituvien happojen uuttoon.

6.2 Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (UPLC-MS/MS)

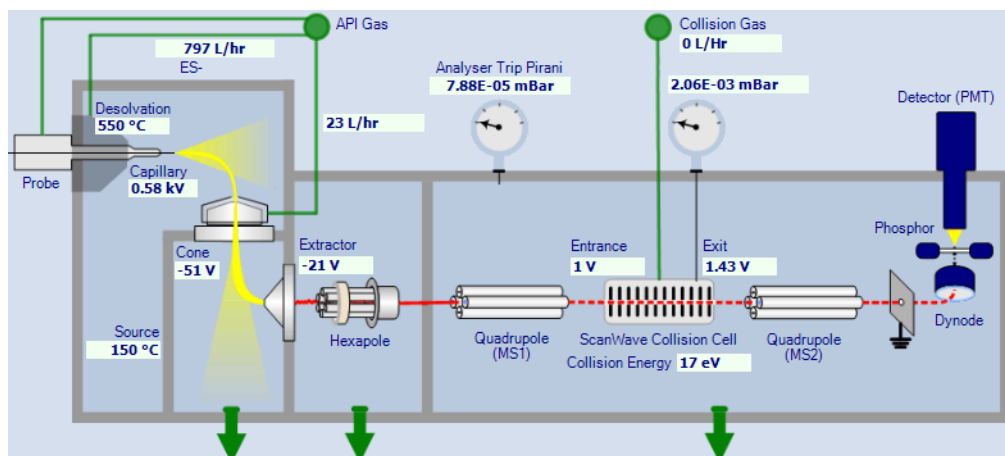
Kehitettyssä menetelmässä mittaukset tehtiin nestekromatografi-massaspektrometrillä. Yhdisteiden kromatografiseen erotukseen käytettiin Watersin Acquity UPLC® -laitteistoa (*Ultra Performance Liquid Chromatography*; ks. liite 1, kuva D:n vasen laita), jonka suorituskyky on korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC) parempi. Keskeisimmät UPLC:n tarjoamat edut ovat lyhyt analyysiaika, hyvä erotustehokkuus ja parempi herkkyys, mikä lisää analytiikan kustannustehokkuutta.

Keskeisin uusi tekninen ratkaisu UPLC-laitteistossa on se, että stationääri-faasipartikkelit ovat halkaisijaltaan pienempiä kuin HPLC-kolonneissa (tyypillisesti 1,7 µm vs. 5,0 µm). Pienempien partikkelien ansiosta faasin adsorptiopinta-alasta tulee suurempi ja erottuvien piikkien pohjaluvuiksi saadaan samoissa olosuhteissa suuremmat arvot, koska tasapainoprosesseja kiinteän ja liikkuvan faasin välillä ehtii tapahtua enemmän kuin suuripartikkelisessa kolonnissa. Tällöin piikeistä tulee muodoltaan kapeampia ja erotuksessa päästään HPLC:tä parempaan resoluutioon sekä mittausherkkyyteen. [45.]

Analyysiaika lyhenee, koska pienten faasipartikkelien myötä virtausnopeutta voidaan kasvattaa ja/tai kolonnia voidaan lyhentää. Virtausnopeuden kasvattaminen lisää vastapainetta kolonnissa ja kapillaareissa, joten UPLC-laitteet on suunniteltu kestävänsä hyvin suuria paineita, jopa 15 000 psi (1034 bar) asti. Mahdollisimman lyhyen kolonnin sekä mahdollisimman suuren virtausnopeuden käyttäminen vähentää näytevyöhykkeen leviämistä, koska prosessin nopeutuessa piikkejä levittävää diffuusiota ei ehdi merkittävästi tapahtua.

Kromatografisen erotuksen jälkeen yhdisteet tunnistettiin ja niiden määrälliset osuudet mitattiin Watersin Xevo™ TQ MS -massa-analysaattorilla (ks. liite 1, kuva D:n oikea laita). Prosessin aluksi määritettävät yhdisteet tulee saada erotetuksi LC-kolonnista saapuvan liuotinvirtauksen joukosta. Kehitettyssä menetelmässä tähän käytettiin sähkösumutusionisaatiota (ESI, *Electrospray Ionization*). LC-MS-yhdistelmätekniikassa laitteistojen välinen liitäntä on teknisesti haastavampaa toteuttaa kuin GC-MS:lla [44, s. 488].

Kuvassa 1 esitetään Xevo™ TQ MS -analysaattorin toimintaperiaate kaavio-kuvana, joka on peräisin laitteiston MassLynx-ohjelmistosta. ESI-tekniikalla toteutettu laitteistojen välinen liitäntä sijoittuu kuvan vasempaan laitaan.



Kuva 1. Watersin Xevo™ TQ MS -laitteiston toimintakaavio

LC:ltä saapuva eluentsivirtaus sumutetaan ohuen kapillaarin (*capillary*) läpi sumutuskammioon. Sisäänmenokartion (*cone*) ja kapillaarin välisen potentiaalieron seurauksena eluointiliuoksesta muodostuu sähköisesti varautuneita pisaroita, joiden varaustiheys kasvaa liuotinmolekyylien haihtuessa kuuman typpikaasun vaikutuksesta (*desolvation*). Lopulta sähköisen poistovoiman voittaessa pintajännityksen pisarat hajoavat pieniksi aerosolihiukkasiksi, jotka voidaan ohjata laitteistossa eteenpäin. Liuottimen haihduttua jäljelle jäävät tutkittavien yhdisteiden molekyyli-ionit. Analyyyteistä hapot, joiden pK_a on selvästi alhaisempi kuin ajoliuoksen pH, jäävät liuottimen poiston jälkeen deprotonoituneeseen muotoonsa. [44, s. 488–490; 46, s. 211–212.]

ESI-tekniikasta on olemassa sekä positiivinen että negatiivinen sovellus. Kapillaarin ja sisäänmenokartion jännite-ero voidaan valita siten, että ionisoitavasta liuoksesta joko poistuu elektroneja tai siihen saapuu niitä lisää sumutuskammion ionilähteestä (*source*). Makeutusaineille kehitetyssä menetelmässä kohdeyhdisteet ionisoitiin negatiivisella ESI:llä, jonka tuottamien molekyyli-ionien varaus on aina negatiivinen. ESI:n negatiivista muotoa käytettiin, koska analyytit ovat luonteeltaan helposti deprotonoituvia. Negatiivisessa ESI:ssä molekyyli-ioni on yleensä alkuperäisen molekyylin deprotonoitunut muoto $[M-H]^-$, mutta molekyylistä riippuen myös useamman vedyn irtaaminen tai erityyppiset adduktit ajoliuoksen komponenttien kanssa ovat mahdollisia.

Addukti-ionit ovat analyyttimolekyylien ja ajoliuoksen sisältämien yhdisteiden muodostamia molekyylien yhteenliittymiä. Asetaattia sisältävän ajoliuoksen tapauksessa mahdollista negatiivisessa ESI:ssä on muun muassa se, että osa analyyyteistä muodostaa adduktin, joka on muotoa $[M+CH_3COO]^-$. Jos

mittauksissa seurattavaksi molekyyli-ioniksi on valittu vain $[M-H]^-$, jäävät asetaattiadduktin muodostaneet molekyylit mittauksen ulkopuolelle.

Kuvassa 1 vasemman laidan sumutuskammion ionisuihkun muoto edustaa tekniikkaa, joka vähentää ionisoitumisvaiheeseen liittyviä häiriöitä ja erottaa Xevon[™] muiden valmistajien massa-analysaattoreista. Kyseessä on Watersin patentoima Z-spray[™], joka ei puhalla ionivirtausta suoraan kohti kvadrupoleille johtavia kartioita. Analysoitavat molekyyli-ionit ohjataan kartioiden sähkökentän avulla kohti kvadrupoleja Z-kirjaimen kulmia muistuttavassa linjassa, jossa liuotinmolekyylejä kuivaava typpikaasu virtaa ulospäin kartioista. Tällöin liuotinmolekyylit saadaan tehokkaammin erilleen analysoitavista molekyyli-ioneista ja ei-toivottujen addukti-ionien muodostuminen vähenee merkittävästi.

Sumutuskammiosta molekyyli-ionit johdetaan ohjauskartioiden kautta eteenpäin kohti massa-analysaattorin heksa- ja kvadrupolisauvastoa (*hexapole*, *quadrupole*), joka erottelee vielä jäljellä olevan taustan joukosta hajotusprosessiin pääsevän molekyyli-ionin (tai molekyyli-ionit) [44, s. 492]. Heksa- ja kvadrupolisauvaston kyky erotella ioneja niiden massa-varaussuhteen (m/z) mukaan perustuu tasa- ja vaihtojännitteiden sopivaan muunteluun siten, että vain tiettyä m/z -arvoa vastaavat ionit pääsevät kulkeutumaan sauvaston läpi [46, s. 125–126]. Kuten kuvaan 1 merkityistä painelukemista (mbar) nähdään, tässä osassa laitteistoa vallitsee suuri vakuumi, jota ylläpidetään turbopumpuilla.

Törmäytyskammiossa (*collision cell*) spesifisti valikoidulle molekyyli-ionille toteutetaan argonkaasuun törmäyttämällä hajoamisreaktio, jossa molekyyli hajoaa itselleen ominaisiksi fragmenteiksi. Hajoamistuotteet johdetaan törmäytyskammiosta seuraavalle kvadrupolisauvastolle, joka säätelee sitä, että detektorille (*detector*) pääsevät vain tietyn m/z -suhteen omaavat fragmentti-ionit. [44, s. 492.]

Tandemmassatekniikalla (MS/MS) kohdeyhdisteiden kvalifiointi ja kvantitointi toteutuu näytetaustan joukosta hyvin selektiivisesti. Tämän mahdollistaa muun muassa se, että fragmentoitavat molekyyli-ionit pystytään useamman eri kvadrupolin avulla tarkasti erottamaan muun aineksen joukosta ja että laitteistolla pystytään samanaikaisesti mittaamaan useampaa eri hajoamisreaktiota (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*). Prosessin monivaiheisuus ja

useamman yksittäiselle yhdisteelle spesifin fragmentoitumisen havainnointi tuo mittaustekniikkaan sellaista herkkyyttä ja selektiivisyyttä, joka erityisesti orgaanisessa ympäristöanalytiikassa on tarpeen.

6.3 Isotooppilaimennusmassaspektrometria (IDMS)

Isotooppilaimennusmassaspektrometrialla (IDMS, *Isotopic Dilution Mass Spectrometry*) pyritään lisäämään analyysituloksen luotettavuutta sisäisten isotooppileimattujen standardien avulla. IDMS:n hyödyntäminen on suosittua varsinkin orgaanisessa analytiikassa, jossa esikäsittelyyn ja laitetekniikkaan usein liittyy häiriötekijöitä. IDMS-standardeina käytetään analyyttien massa-leimattuja vastineita. Analyysimenetelmissä näitä standardeja voidaan hyödyntää joko 1) näytteisiin esikäsittelyprosessin alussa lisättävinä, menetelmän saannosta tiedon antavina surrogaatteina⁷ tai 2) ennen injektiota lisättävinä, mittalaitteisto- ja matriisiperäisiä häiriöitä korjaavina instrumenttistandardeina. [47, s. 1–4.]

Surrogaatin tulee olla mahdollisimman pitkälti määritettävän yhdisteen tai yhdisteiden kaltainen. Molekyyli­massan on oltava eri kuin menetelmän kohdeyhdisteillä, jotta mittaussignaali pystytään MS-laitteistolla erottamaan toisistaan. Saatavilla olevat orgaaniseen IDMS-analytiikkaan tarkoitetut isotooppistandardit ovat joko ¹³C-hiili- tai deuteriumleimattuja. Molekyylit ovat muutoin identtisiä vastaaviin natiiviyhdisteisiin nähden, mutta osa hiilistä tai vedyistä on korvattu normaalia raskaammilla isotoopeilla.

Deuteriumleimatut yhdisteet sisältävät raskasta vetyä, jonka molekyylimassa on kaksinkertainen natiivivetyyn nähden eli 2 amu. Hiilileimana käytetään tyypillisimmillään isotooppia, jonka massa on 13 amu, kun natiivihie­lellä se on 12 amu. Tämän opinnäytteen menetelmän neljästä kohdeanalyytistä kolmelle oli saatavilla deuteroitu vastine ja yhdelle hiilileimattu versio. Isotooppien saatavuus asetti siten rajoituksia sille, millä tavoin IDMS:ää oli mahdollista hyödyntää. Valikoima oli kuitenkin melko runsas siihen nähden, mitä aiemmin on ollut saatavilla: tähän mennessä raportoiduissa vastaavissa menetelmissä massaleimatuista standardeista on ollut käytössä vain deuteroitu sukraloosi [4; 18].

⁷ Englanninkielinen alkuperäistermi on *surrogate*, jonka merkitys suomeksi on 'korvike' – kemiallisen analytiikan kontekstissa suomenkieliseksi spesifiksi termiksi kuitenkin on vakiintunut muoto *surrogaatti*. Julkaisuissa IDMS-standardien nimityskäytänteissä ilmenee jonkin verran vaihtelua. Tässä opinnäytteessä käytettäviksi termeiksi valittiin *surrogaatti* ja *instrumenttistandardi*.

Näytteeseen esikäsittelyn alussa lisättävä surrogaatti antaa tiedon koko analyysiprosessin saannosta. Orgaanisen analytiikan tavallinen ongelmakohta on analyyttien erottaminen taustamatriisistaan. Tässä opinnäytteessä kehitetty menetelmän esikäsittelyvaiheista SPE-uutto on kaikkein riskialttein aiheuttamaan hävikkiä saantoon. Uuton vaikutus lopputulokseen pystytään korjaamaan lähtöpitoisuudeltaan tunnetulle surrogaatille tai surrogaateille näytekohtaisesti määritettyjen saantoprosenttien avulla. Tämä kuitenkin edellyttää sitä, että surrogaattimolekyylin täytyy olla riittävän samankaltainen kuin kaikki ne analyytit, joiden saanto sen avulla korjataan. Luotettava saantokorjaaminen edellyttää lisäksi sitä, että surrogaatin prosentuaalinen saanto ylittää riittävän korkealle tasolle – suosituksena on, että se olisi vähintään 70 %.

Massaleimattujen surrogaattien avulla päästään tarkempiin lopputuloksiin kuin monia epävarmuustekijöitä sisältävillä tavanomaisilla standardinlisäyskokeilla, joissa näytteitä spiikataan tutkittavilla natiiviyhdisteillä [47, s. 2]. Natiiviyhdisteillä toteutettavissa saantokokeissa suurimpana heikkoutena on oletus siitä, että kaikki näytesarjan näytteet ovat käyttäytyneet analyysiprosessissa samalla tavoin. Erilaisten vesimatriisien sisältämät tuntemattomat komponentit vaikuttavat kukin ominaisella tavallaan muun muassa analyyttien pidättäytymiseen SPE-patruunaan. Erillisten saantokokeiden toteuttaminen jokaiselle näytematriisille on myös työlästä. IDMS-menettely lisää siten lopputuloksen luotettavuutta ja säästää työaikaa, koska alkuperäisen analyyttipitoisuuden mittaaminen sekä saantokoe pystytään toteuttamaan samanaikaisesti yhdestä näytteestä.

Molekyylien ulkopinnan rakenteella on keskeinen merkitys SPE-faasin adsorption kannalta. Ulkopinta on hiilileimattun isotoopin ja natiiviversion välillä samanlainen. Deuterointi puolestaan muuttaa molekyylin pinnan fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, joten adsorptiokäyttäytyminen ei ole täysin identtistä natiiviin nähden. Hiilileimattujen isotooppien käyttö surrogaatteina onkin suositeltavinta, koska natiiviyhdisteen ja sen hiilileimattun vastineen pidättäytyminen SPE-patruunaan tapahtuu joka analyysikerralla samalla tavoin ja saannot siten ovat luotettavasti rinnastettavissa toisiinsa.

Ennen injektiota lisättävän standardin tehtävänä on korjata injektion toistettavuutta ja muita laitteistoperäisiä häiriöitä sekä matriisiefektiä. Tähän tarkoitukseen deuteroidut standardit ovat riittävän samankaltaisia natiiviyhdisteisiin nähden. Koska määritettävistä keinotekoisista makeutusaineista saata-

villa oli hiilileimattu versio vain sakariinille, se valittiin menetelmän surrogaatiksi. Instrumenttistandardeina puolestaan käytettiin deuteroituja isotooppeja.

IDMS:n avulla kaikkein tarkimpiin tuloksiin päästäisiin, jos jokaiselle tutkittavalle yhdisteelle olisi käytössä omat yksilölliset surrogaattinsa ja instrumenttistandardinsa. Käytännössä tämä ei kuitenkaan aina ole mahdollista. Tällöin menetelmän optimoinnin yhteydessä tulee testata, kuinka monelle tutkittavista yhdisteistä voi käyttää samaa surrogaattia ja/tai instrumenttistandardia.

Kvantitointi IDMS:n sisältävässä analyysimenetelmässä toteutetaan useimmiten ulkoisella kalibrointisuoralla, jonka liuotintausta on sama kuin näytteissä. Kalibrointiliuoksiin lisätään ennen mittauksia tunnettu pitoisuus massa-leimattuja standardeja. Kalibrointiliuoksiin ja näytteisiin lisätään kutakin standardia samat pitoisuudet. Yksittäisen analyytin kvantitointi toteutetaan sille optimia instrumenttistandardia vasten. Tällöin kalibrointikuvaaja piirretään siten, että vaaka-akselilla esitetään pitoisuus ja pystyakselilla analyytistä mitattu vaste jaettuna samassa injektiossa instrumenttistandardista saadulla vasteella. Myös näytteistä määritetään vasteiden suhde samalla periaatteella ja tätä signaalia vastaava pitoisuus luetaan kalibrointisuoralta. Lopuksi tulos korjataan surrogaatin osoittaman saannon mukaiseksi.

7 MENETELMÄN KEHITTÄMISPROSESSI

Menetelmän kehittämisprosessin kuvauksessa edetään siinä järjestyksessä, missä uuden LC-MS/MS-menetelmän optimointi tulee toteuttaa määritettävistä analyyteistä riippumatta. Instrumenttianalyttisista parametreista aloittaminen on tarkoituksenmukaisinta, koska toistettava ja riittävän herkkä mitaussignaali on edellytys sille, että menetelmän muita yksityiskohtia, kuten esimerkiksi esikäsittelyn eri vaihtoehtoja, voidaan alkaa testata. Kehitystyön kaikissa vaiheissa tulee johdonmukaisesti pitää kiinni siitä, että jokaisessa testisarjassa on kerrallaan vain yksi muuttuja.

7.1 Instrumenttianalyttiset parametrit

LC-erotuksen ja MS/MS-asetusten optimointi kytkeytyi pitkälti toinen toisiinsa, koska kyse on yhdistelmätekniikasta. Instrumenttitekniikoiden optimoinnin keskeisimmät elementit on kuitenkin selkeyden vuoksi pyritty erottamaan omiksi kokonaisuuksikseen.

7.1.1 Kolonni

LC-olosuhteiden testaus alkaa kolonnin valinnalla. Kolonnin ominaisuuksien tulee olla sopivat sekä käytössä olevan laitteiston että määritettävien analyyttien polaarisuuden kannalta. Koska menetelmää ryhdyttiin toteuttamaan Watersin UPLC-laitteistolla, käytettävissä olevien kolonnien määrä rajautui laitevalmistajan kyseiseen laitteistoon tarjoamiin vaihtoehtoihin.

Jos optimointia lähdettäisiin toteuttamaan laajimmalla mahdollisella tavalla, tulisi järjestelmällisesti testata useita eri kolonnityyppejä. Näin laajaan kokeelliseen testaukseen ei kuitenkaan tässä menetelmässä ollut tarkoituksenmukaista ryhtyä. Valinnan perusteeksi riittivät julkaisuista löydetty tiedot sekä SYKE:n laboratoriossa rutiinikäytössä olevista UPLC-menetelmistä saatu kokemus. Kolonniksi valikoitui orgaanisessa analytiikassa monipuoliseen yleiskäyttöön soveltuva ja laajalla pH-alueella toimintakykyinen Acquity UPLC BEH (*Bridged Ethyl Hybrid*) C18 [48]. Analyyttistä kolonnia suojaa vaksi komponentiksi laitteistoon liitettiin saman valmistajan VanGuard™ BEH C18 -esikolonne.

Ennen lopullista valintaa analyyttisestä kolonnista testattiin kahta pituusvaihtoehtoa: 5 cm ja 10 cm. Muutaman testiajon jälkeen oli selvää, että 5 cm:n pituus riittää kaikkien neljän analyytin erottumiselle ja tällöin yhdisteet myös

saatiin erottumaan kapeampina vyöhykkeinä kuin 10 cm:n kolonnilla. Mitä lyhyempää kolonnia pystytään käyttämään, sitä paremmin toteutuu UPLC-tekniikan mukanaan tuoma keskeisin hyöty: analyysiaika saadaan mahdollisimman lyhyeksi ilman, että erotustehokkuudesta joudutaan tinkimään.

7.1.2 Ajoliuos

Ajoliuoksen liuotinkomponenteiksi valittiin vesi ja metanoli, koska määritettävillä yhdisteillä on hyvä liukoisuus niihin molempiin. Kaikki menetelmän analytit liukenevat myös asetonitriliin, joka alhaisen viskositeettinsa ja korkean erotustehokkuutensa vuoksi on tyypillinen LC-menetelmien orgaaninen liuotin. Kun huomioidaan myös taloudelliset seikat, metanoli kuitenkin on kustannustehokkaampi liuotinvalinta kuin asetonitrili.

Eri julkaisuissa raportoiduissa makeutusainemenetelmissä MeOH/H₂O-yhdistelmä on tyypillinen. Aiemman tiedon nojalla todennäköistä oli, että optimaalisia LC-olosuhteita ei tässä menetelmässä voida saavuttaa puhtailla liuottimilla, vaan sekä metanoliin että veteen tulee lisätä retention kasvattamiseksi jokin tai joitakin lisäaineita.

Sukraloosille tai syklamaatille kehitettyjen yksianalyttisten menetelmien MeOH/H₂O-ajoliuoksissa tavanomaisena lisäaineena on ollut 0,10–0,15 % etikkahappoa [31; 34]. Useiden keinotekoisien makeutusaineiden samanaikaiseen määrittämiseen soveltuviissa ympäristöanalyttisissä LC-MS/MS-menetelmissä MeOH/H₂O-eluenttiparin lisäaineena puolestaan on ollut ammoniumasetaatti (CH₃COONH₄) pitoisuudella 20 mM tai 1 mM [4; 18]. Tämän perusteella hyvin todennäköiseltä vaikutti, että myös tässä menetelmässä CH₃COONH₄:n lisääminen eluenttiin osoittautuu tarpeelliseksi. Eri ammoniumasetaattipitoisuuksien lisäksi myös muita vaihtoehtoja testattiin – mukaan lukien puhtaat liuottimet, koska mittauslaitteiston puhtaana säilymisen kannalta suositeltavimpia ovat puskuroimattomat eluentit. Lisäaineina kokeiltiin muurahaishappoa, ammoniumformaattia, ammoniumasetaattia sekä viimeksi mainitun ja muurahaishapon seosta. Edellä mainituista vaihtoehtoista kaikki muut paitsi pelkkä ammoniumasetaatti rajautuivat jo hyvin aikaisessa vaiheessa pois, koska niillä ei ollut yhtä suotuisaa vaikutusta yhdisteiden kiinnittymiseen kolonnin käänteisfaasin pintaan. CH₃COONH₄:n suhteen tarkempi optimointi toteutettiin pitoisuusalueella 0–10 mM.

Sopivimmaksi $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -pitoisuudeksi osoittautui 2 mM. Valinnan perusteet ovat nähtävissä liitteessä 2. Liitteessä esitetään rinnakkain kromatogrammit, joissa muuttujana on ammoniumasetaattipitoisuus välillä 0–4 mM. Testinäytteen pitoisuus oli kaikkien analyyttien suhteen 50 ng/ml, minkä vuoksi SCL:a kromatogrammeissa ei näy lainkaan. Sen osalta pitoisuuden olisi pitänyt olla vähintään viisinkertainen muihin nähden, jotta signaali olisi erottunut taustakohinasta.

Liitteen 2 kromatogrammissa A eluenttina oli puhdas vesi ja metanoli. Yhdenkään yhdisteen retentio ei ollut riittävää, vaan suurin osa analyyttimolekyyleistä kulkeutui yhtenä rintamana suoraan kolonnin läpi ilman, että erottumista juurikaan tapahtui. Kromatogrammissa B eluentin $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -pitoisuus oli 1 mM ja erottumista oli tapahtunut jo selvästi enemmän kuin puhtaila liuoksilla toteutetussa mittauksessa. ACS:n pidättäytyminen ei kuitenkaan ollut vielä riittävää, koska piikki levisi lähes kahteen osaan.

Ammoniumasetaattipitoisuuksilla 2 mM ja 4 mM (liitteen 2 kromatogrammit C ja D) kaikkien yhdisteiden retentio kolonnissa oli riittävää ja piikit erottuivat kapeina vyöhykkeinä. Pitoisuudella 2 mM saatiin kaikista kolmesta kromatogrammissa näkyvästä yhdisteestä merkittävästi suurempi vaste kuin 4 mM:n pitoisuudella. Valintana 2 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ oli sopiva myös siinä mielessä, että kyseinen suolapitoisuus on niin pieni, että se ei aiheuta laitteistossa suurta likaantumisen riskiä. Vasteen pieneneminen korkeammilla ammoniumasetaattipitoisuuksilla (4–10 mM) todennäköisesti aiheutuu ESI-ionisaatiota heikentävästä ionisuppressiosta.

ACS, SAC ja CYC ovat happoja, joiden pK_a -arvot arvot ovat ≤ 2 . Jotta happoista riittävän suuri osa olisi protonoituneessa muodossa poolittomaan stationäärifaasiin tarttuakseen, tulisi ajoliuoksen pH:n olla vähintään yhden yksikön verran alle pK_a :n. Jos kohdeyhdisteiden pK_a -arvot ovat kovin matalat, kuten tämän menetelmän tapauksessa on, ei ajoliuosta voida säätää niin happamaksi, että suurin osa happomolekyyleistä olisi neutraalissa muodossa. Tällöin on turvauduttava ioniparikromatografiaan (IPC), jota myös tämän menetelmän LC-erotuksessa päädyttiin soveltamaan, koska ammoniumasetaatti osoittautui sopivaksi ajoliuoksen lisäaineeksi.

Eluenttiin lisättyinä $\text{CH}_3\text{COONH}_4$:n kaltainen kvaternäärinen ammoniumyhdiste toimii ioniparireagenssina, joka parantaa näytteen ionimuotoisten hap-

pojen retentiota. Vaikutus perustuu siihen, että määrittelyn kohteena olevat anioniset yhdisteet muodostavat ajoliuokseen lisätyn kationisen elementin kanssa ulkoisesti neutraalin ioniparin, joka pystyy heikoilla sidoksilla hydrofobisesti adsorboitumaan poolittoman käänteisfaasin pintaan. Ilman NH_4^+ -vastaionia anionimuotoiset ACS, SAC ja CYC eivät juuri lainkaan pysty kiinnittymään kolonnin käänteisfaasiin, kuten liitteen 2 kromatogrammit selkeästi osoittivat. Eri pH-olosuhteissa neutraalina pysyvän SCL:n retentioon ionipari-reagenssilla ei ole mitään vaikutusta.

7.1.3 Näytteen liuotintausta

Ajoliuoksen lisäksi yhdisteiden pidättäytymiseen kolonnissa vaikuttaa laitteistoon injektoitavan näytteen liuotintausta. Näytteelle sopivin liuotintausta testattiin kokeellisesti standardiseoksilla, joissa taustamatriisin $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -suhde vaihteli. Testeissä havaittiin, että varsinkin ensimmäisenä eluoituva ACS reagoi herkästi näytetaustan muutoksiin. Tuloksena oli, että injektoitava näyte saa sisältää metanolia enintään 30 %, jotta ACS juuri ja juuri pidättyy yhtenä rintamana stationäärifaasiin, eikä osa molekyyleistä kulkeudu suoraan kolonnin läpi. Retention kannalta sopivimmaksi metanolin osuudeksi osoittautui 0–10 %. Menetelmällä analysoidtavat näytteet saavat siten sisältää metanolia enintään 10 % ja loppuosan tulee olla vettä, jotta kaikki yhdisteet eluotuvat kolonnista riittävän kapeina vyöhykkeinä.

7.1.4 Gradientti

Näytteen sisältämien liuotinsuhteiden ja ajoliuoksen koostumuksen lisäksi varsinkin LC-erotuksen gradientin alun koostumuksella osoittautui olevan ratkaiseva vaikutus yhdisteistä nopeimmin eluoituvan ACS:n erotustehokkuuteen. Jos aloituksessa on läsnä liikaa metanolia, alkaa ACS:n piikki leviätä. Eri vaihtoehtojen kokeilemisen jälkeen päädyttiin siihen, että gradientti tulee aloittaa mahdollisimman suurella⁸ vesipitoisuudella. Eluentin virtausnopeus 0,4 ml/min osoittautui sopivimmaksi menetelmään valitun 5 cm pituisen kolonnin kannalta. UPLC-tekniikan tarjoama nopeus hyödynnettiin menetelmässä tehokkaasti, koska LC-ajon kokonaiskestoksi tuli vain 3 minuuttia.

⁸ 100 %:n sijaan kuitenkin käytettiin osuutta 99,9 %, koska laitteiston binääripumppujen teknisen toimivuuden kannalta parasta oli pitää molemmat pumput toiminnassa koko LC-metodin ajan.

Taulukkoon 3 on koostettu tiedot optimoidusta gradientista sekä kaikista muista tekijöistä, jotka liittyvät LC-laitteiston toimintaan.

Taulukko 3. Gradientti ja LC-erotuksen muut yksityiskohdat

Aika (min) LC-metodin alusta	Virtaus (ml/min)	A: 2 mM CH ₃ COONH ₄ /H ₂ O (%)	B: 2 mM CH ₃ COONH ₄ /MeOH (%)
Aloitus	0,400	99,9	0,1
0,10	0,400	99,9	0,1
2,00	0,400	0,1	99,9
2,30	0,400	0,1	99,9
2,40	0,400	99,9	0,1
3,00	0,400	99,9	0,1
Näytesilmukan tilavuus		10,0 µl	
Injektio-tilavuus		7,5 µl	
Injektio-tekniikka		"Partial Loop With Needle Overfill"	
Laimea pesuliuos		100 % Milli-Q-H ₂ O	
Vahva pesuliuos		10 % Milli-Q-H ₂ O + 90 % MeOH	
Tiivisteiden pesuliuos		90 % Milli-Q-H ₂ O + 10 % MeOH	
Näytetilan lämpötila		7 °C	
Kolonnin lämpötila		40 °C	

Taulukon 3 mukaisella gradientilla kohdeyhdisteet eluoituivat kolonnista aikavälillä 0,9–1,5 minuuttia. Gradientin kokonaiskestoksi kuitenkin määriteltiin yhteensä 3 minuuttia, jotta kolonni ehtii puhdistua ja tasapainottua kunnolla ennen seuraavaa näytettä. Liitteessä 3 annetaan esimerkit kaikkien menetelmällä kvantitoitavien yhdisteiden kromatografisesta erottumisesta.

Huomiota näissä kromatogrammeissa saattaa kiinnittää erityisesti se, kuinka lähellä toisiaan ACS ja SAC eluoituvat. Molemmat yhdisteet olivat polaarisuudeltaan siinä määrin samantyyppisiä, että niiden välistä resoluutiota ei saatu gradienttia säätämällä suuremmaksi. Jos detektio toteutettaisiin vähemmän spesifisellä tekniikalla kuin MS/MS, olisi ACS:n ja SAC:n välinen etäisyys liian pieni luotettavan kvantitoinnin kannalta.

Piikkien läheisyys voidaan kuitenkin LC-MS/MS-menetelmän tapauksessa hyväksyä. Yhdisteiden päällekkäisyys ei MRM-mittauksessa heikennä selektiivisyyttä, koska kustakin yhdisteestä seurataan samanaikaisesti kahta erilaista, *m/z*-arvoiltaan yksilöllistä molekyyli-ionin fragmentoitumisreaktiota. Molemmat detektiossa seurattavat siirtymät ovat määritettävälle yhdisteelle ominaiset, ja mitattu signaali kuvaa spesifisti vain yhden analyytin antamaa vastetta, vaikka ne LC-erotuksessa sijoittuisivatkin päällekkäin.

7.1.5 Ionisaatio-olosuhteet

Massaspektrometrin parametrien optimointi toteutettiin käymällä järjestelmällisesti läpi taulukon 4 mukainen testimatriisi, josta jokaisella testikierroksella muutettiin yhtä ominaisuutta kerrallaan. Mittaukset toteutettiin taulukossa 4 kuvatussa järjestyksessä. Aina kun yksittäisen parametrin testisarja valmistui, valittiin optimaalisin arvo, joka pidettiin vakiona siitä eteenpäin prosessin loppuun saakka. Testinäytteenä käytettiin veteen laimennettua standardiseosta (ACS, SAC, CYC 50 ng/ml ja SCL 250 ng/ml⁹). Näyte johdettiin MS/MS-laitteistoon LC-erotuksen kautta. Ajoliuoksista ja gradientista oli tässä vaiheessa kokeellisesti löydetty toimivat, lopulliset versiot.

Taulukko 4. MS/MS-laitteiston parametrien optimoinnin tulokset

Parametri ja yksikkö	Testialue	Optimoitu arvo
Kapillaarin jännite (kV)	0,1–2,5	0,5
Kartion jännite (V)	10–70	ACS 25; SAC 35; CYC 45; SCL 30
Kuivauskaasun lämpötila (°C)	200–650	550
Kuivauskaasun virtaus (l/h)	600–1200	800
Näytekartion kaasuvirtaus (l/h)	5–60	23
Törmäyskaasun virtaus (ml/min)	0,05–0,5	0,07
Törmäysenergia (V)	10–50	ACS 15; SAC 20; CYC 23; SCL 15

Päätökset taulukossa 4 esitetyistä optimoiduista arvoista tehtiin siten, että valikoiduksi kunkin ominaisuuden kohdalla tuli aina se yksittäinen arvo, joka tuottaa mahdollisimman suuren vasteen kaikista neljästä analyytistä. Kompromisseilta ei tässä vaiheessa voitu välttyä, koska suurimman osan arvoista tuli olla samat kaikille yhdisteille; ainoastaan kartion jännite ja törmäysenergia oli mahdollista valita samaan menetelmään yhdistekohtaisesti.

Menetelmän massaleimatuille yhdisteille ei optimoitu yksilöllisiä kartion jännitteitä ja törmäysenergioita. Niille käytettiin samoja arvoja kuin vastaaville natiiviyhdisteille. Isotoopit voisi tuki ottaa mukaan optimointiprosessiin. Se ei kuitenkaan ole välttämätöntä, koska IDMS-standardeja käytetään mittauksissa aina niin suurina pitoisuuksina, että signaali voidaan luotettavasti detektoida natiiviyhdisteille optimoiduilla asetuksilla.

⁹ SCL:lle valittiin muihin nähden viisinkertainen pitoisuus, koska siitä mitattavissa olevan signaalin oli havaittu samalla pitoisuustasolla jäävän huomattavasti muita pienemmäksi. Optimoinnin aikana selväksi tuli, että SCL-pitoisuus olisi kannattanut valita vieläkin suuremmaksi esimerkiksi kymmenenkertaiseksi muihin yhdisteisiin nähden – tällöin SCL:n vaste olisi saatu mitattua toistettavuudeltaan luotettavammalla tasolla kaikissa optimointiolosuhteissa.

7.1.6 Detektoitavat ionit

Jotta analyyttien kvalifiointi ja kvantitointi voidaan toteuttaa MS/MS-laitteistolla, tulee kohdeyhdisteistä tuntea ESI-tekniikalla ionisoitavien molekyyli-ionien (englanniksi *precursor ion* tai *parent ion*) m/z -arvot. Lisäksi tiedossa on oltava vähintään kaksi tälle molekyyli-ionille spesifiä hajoamistuotetta (*product ion* tai *daughter ion*) tai toinen lähtöioni ja yksi sen spesifi hajoamistuote. Laitteiston törmäytyskammiossa tapahtuvaa lähtöionin hajoamisreaktiota tietyksi fragmentti-ioniksi nimitetään siirtymäksi (*transition*).

Yleisellä tasolla on linjattu, että yksittäisestä yhdisteestä detektoitavia siirtymiä on oltava vähintään kaksi, jotta menetelmää voidaan pitää kvantitatiivisesti luotettavana. Useamman eri siirtymän samanaikaiseen mittaamiseen MS/MS-laitteistossa käytetään *Multiple Reaction Monitoring* -tekniikkaa (MRM). Taulukkoon 5 on koottu menetelmän keskeisimmät MRM-asetukset: kunkin mitattavan yhdisteen kaksi spesifistä siirtymää ja niiden jako retentioaikojen perusteella eri aikaikkunoihin. Taulukossa osoitetaan myös, kumpi hajoamisreaktioista on ensisijainen eli se, jonka määrällinen osuus aina on suurin ja jonka pohjalta kvantitointi toteutetaan. Liitteen 3 kromatogrammit F ja G osoittavat, että jokaisesta kvantitoitavasta natiiviyhdisteestä saatiin menetelmällä mitattua vaaditut kaksi siirtymää.

Taulukko 5. Menetelmän MRM-asetukset

Aikaikkuna	Yhdiste	Retentioaika (min)	Kvantitointisiirtymä (m/z)	Kvalifiointisiirtymä (m/z)
1: 0,0–1,2 min	ACS	0,95	162 > 82	162 > 78
	<i>d</i> -ACS	0,94	166 > 86	–
	SAC	1,06	182 > 106	182 > 42
	¹³ C-SAC	1,06	188 > 106	–
2: 1,1–1,6 min	CYC	1,26	178 > 80	178 > 96
	<i>d</i> -CYC	1,24	189 > 80	–
3: 1,3–1,8 min	SCL	1,48	395 > 359	397 > 361
	<i>d</i> -SCL	1,47	401 > 365	–

Ikkunoiden alku- ja loppuajat on tarkoituksella sijoitettu hieman päällekkäin, koska osa yhdisteistä eluoituu LC:ltä niin lähellä toisiaan. Deuteroitujen yhdisteiden natiiveja hieman lyhyempi retentio oli pääsyynä siihen, miksi aikaikkunat jouduttiin sijoittamaan osittain limittäin. Tällöin myös natiiviyhdisteiden retentioajoissa tapahtuva muun muassa matriisista riippuvainen satunnaisvaihtelu tulee huomioiduksi. Liaksi ikkunoissa ei kuitenkaan saa olla päällekkäisyyttä, jotta mittauksen herkkyys ei kärsi.

7.2 Kalibrointi

Menetelmän kalibrointi perustuu analyyteistä mitattavan vasteen ja pitoisuuden välillä vallitsevaan riippuvuuteen. Kokeellisesti selvitettiin, onko riippuvuus luonteeltaan lineaarista eli pysyykö pitoisuuden ja mittaussignaalin välinen suhde vakiona pitoisuuden muuttuessa. Kehitetyn menetelmän lineaarisuutta testattiin pitoisuusalueella, joka ACS:n, SAC:n ja CYC:n osalta oli 0,07–100 ng/ml ja SCL:n 0,30–460 ng/ml. Kalibroitiliuokset laimennettiin gravimetrisesti ja suoria piirrettäessä käytettiin kolmen desimaalin tarkkuudella punnitustuloksista liuottimen tiheyden avulla laskettuja pitoisuuksia.

Jo menetelmänkehityksen alkuvaiheessa oli selvää, että sukraloosin toteamis- ja määritysrajat tulevat jäämään muita analyyttejä korkeammalle. Muissa vastaavissa menetelmissä SCL:n LOD ja LOQ ovat olleet 5 tai jopa 20 kertaa korkeampia kuin ACS:lla [4; 18]. LC-MS/MS-parametrien optimoinnin yhteydessä havaittiin, että myös tässä menetelmässä samasta pitoisuudesta mitattuna ACS:n signaali oli voimakkain. SCL:n heikko mittausherkkyys selittyy osin sillä, että molekyyli on massaltaan kutakuinkin kaksinkertainen ACS:iin, SAC:iin ja CYC:iin nähden. Suuren molekyyli­massan vuoksi sen molaarinen konsentraatio on muita analyyttejä selvästi pienempi samassa massakonsentraationa ilmaistussa pitoisuudessa.

Kalibroitiliuokset laimennettiin Milli-Q-veteen, koska laitteella mitattavien standardien ja näytteiden taustasta haluttiin saada mahdollisimman vesipitoinen. Tämä edellytys ilmeni LC-olosuhteiden optimoinnin yhteydessä. Kalibroitistandardien ja kvantitoitavien näytteiden liuotintaustan tulee olla mahdollisimman identtinen. Kalibroitiliuokset sisälsivät pienen määrän kantaliuoksista peräisin olevaa metanolia. Enimmillään kalibroitiliuosten metanoliosuudeksi tuli noin 2 % (V/V). Instrumenttistandardien annostelun yhteydessä myös näytteisiin jouduttiin lisäämään hieman metanolia. Liuotintaustan mahdolliset erot näytteiden ja kalibroitiliuosten välillä olivat tässä tapauksessa niin pieniä, ettei niillä ole vaikutusta tulosten laatuun.

Menetelmässä sovellettiin ulkoista kalibrointia, johon yhdistyy sisäisten massaleimattujen standardien käyttö. IDMS-standardia hyödynnettiin kehitetyssä menetelmässä kahdessa eri funktiossa: esikäsittelyn alussa näytteeseen lisättävänä surrogaattina ja juuri ennen injeksiota lisättävänä instrumenttistandardina. Kalibroitiliuoksia ei näytteiden tapaan esikäsitellä, joten niihin kaikki standardit lisätään ennen injeksiota yhdellä kertaa. Tämän menetel-

män kalibrointikuvaajissa natiivistandardeista mitatut vasteet suhteutettiin analyylille optimin instrumenttistandardin signaaliin ja esitettiin pitoisuuden funktiona. Tämä kuitenkin ei ole ainoa tapa massaleimastandardeja hyödyntävän kalibroinnin toteutukseen, vaan myös muunlaisia kvantitointiperiaatteita on mahdollista käyttää.

Koska ^{13}C -SAC oli ainoa saatavilla ollut hiilileimattu keinotekoinen makeutusaine, sitä päätettiin käyttää menetelmän surrogaattina. SAC:sta ei ollut lainkaan saatavilla deuteroitua versiota. Tällöin SAC:n instrumenttistandardiksi tuli valita jompikumpi lähellä eluoituvista deuteroiduista yhdisteistä eli d -ACS tai d -CYC. Vaihtoehtoisista sopivimmaksi osoittautui d -CYC.

Kalibroinnin lineaarisuutta tutkittaessa havaittiin, kuinka olennainen tekijä instrumenttistandardien käyttö on lopputuloksen oikeellisuuden kannalta. Kun pelkillä natiiviyhdisteillä määritettyjen suorien lineaarisuutta verrattiin instrumenttistandardeja vasten kvantitoituihin suoriin, ero oli selkeä: ACS:n, SAC:n ja CYC:n lineaarisuus oli huomattavasti parempi deuteroitujen antamia signaaleja vasten piirretyllä suoralla. ACS:n kohdalla selitysaste (R^2) parani kaikkein eniten – 0,898:sta 1,000:aan. Myös SAC:n ja CYC:n kohdalla instrumenttistandardin käyttö paransi vasteen lineaarisuutta merkittäväällä tavalla. SCL:n lineaarisuuteen instrumenttistandardilla ei ollut havaittavaa vaikutusta: sen selitysasteeksi saatiin molemmissa tapauksissa arvo, joka ylitti organisisessa analytiikassa vakiintuneen suositusarvon $R^2 \geq 0,995$.

Liitteessä 4 esitetään IDMS-standardien avulla samalla ajokerralla määritetyt esimerkkisuorat, joiden selitysasteissa saavutettiin kaikkien yhdisteiden kohdalla varsin korkea-asteista lineaarisuutta kuvaava lukuarvo: 1,000 (ACS), 0,990 (SAC), 0,997 (CYC) ja 0,996 (SCL). Yhdisteistä ainoastaan SAC:n selitysaste ei missään vaiheessa ylittänyt suositusarvoa 0,995.

Kalibroinnin lineaarisuuden mittana ei kuitenkaan voida pitää yksinomaan suoran selitystasetta, vaan myös residuaalien tarkastelu on tarpeen. Tämä on toteutettu liitteessä 4, jossa suorien lisäksi esitetään niiden residuaalikuvaajat. Kaikki kuvaajat on laadittu Watersin MassLynxiin sisältyvällä TargetLynx-datankäsittelyohjelmalla. Suorat olivat lineaarisia myös residuaalien perusteella.

Liitteen 4 kahdella viimeisellä sivulla esitetään mittaustulokset kalibrointiliuoksiin lisätyistä massaleimatuista standardeista, joita jokaiseen liuokseen oli

lisätty sama pitoisuus (*d*-SCL 125 ng/ml, muut 25 ng/ml). Kalibroinnin luotettavuutta tukee se, että kaikkien IDMS-standardien välinen toistettavuus kalibroitisuoran eri pisteissä oli varsin hyvä. %RSD:t olivat 17,8 (*d*-ACS), 13,2 (¹³C-SAC), 7,7 (*d*-CYC) ja 7,3 (*d*-SCL).

ACS:n osalta menetelmä havaittiin lineaariseksi koko testatulla alueella (0,07–100 ng/ml). Muiden analyttien kohdalla mittausherkkyyys ei riittänyt signaalin toistettavaan detektointiin alimmassa testatussa pitoisuudessa. Tulosten nojalla poissuljettua ei ollut, etteikö menetelmä voisi olla lineaarinen testattua laajemmalla pitoisuusalueella. ACS:n kohdalla lineaarisuuden rajaa ei kokeellisesti saavutettu asteikon kummassakaan päässä. ACS:n alimmassa mittauspisteessä signaali-kohinasuhde (S/N) keskimäärin saavutti jopa arvon 100. Niinpä pitoisuutta pystyisi vielä melko paljon alentamaan ennen kuin S/N saavuttaisi detektorajan määritelmän mukaisen minimiarvon 3. Menetelmän muiden yhdisteiden detektoinnin alaraja puolestaan saavutettiin testimittauksissa, mutta toisessa ääripäässä niidenkin lineaarinen alue saattaa jatkua myös nyt testattua korkeampiin pitoisuuksiin.

7.3 Näytteen esikäsittely

Esikäsittelyn kehitystyön alkuvaiheessa testimatriisina käytettiin natiivistandardeilla spiikattua Milli-Q-vettä. Myöhemmässä vaiheessa ryhdyttiin käyttämään mahdollisimman pitkälti aidon kohdematriisin kaltaisia näytteitä: suurimmaksi osaksi Päijänne-tunnelin pintavettä spiikattuna sekä joissakin yksittäisissä kokeissa myös spiikkaamattomia pintavesinäytteitä, jotka olivat peräisin Etelä-Suomen alueelta. Opinnäytetyön toteutuksen aikana ehdittiin empiirisesti keskittyä vain yhteen ympäristönäytematriisiin, joksi valikoitui pintavesi.

Keinotekoiset makeutusaineet ovat luonteeltaan siinä määrin polaarisia, että ne liukenevat hyvin veteen. Vesiliukoisuus tuo esikäsittelyyn monia mahdollisuuksia mutta samalla myös haasteita. Vesiliukoisten yhdisteiden erottaminen vesinäytetaustasta voi toisinaan olla hyvinkin ongelmallista. Erotusprosessin haasteellisuutta lisää se, kuinka paljon eroja määritettävien yhdisteiden funktionaalisuuksissa on.

7.3.1 Suodatus

Pintavesimatriisi sisältää paljon kiinteitä partikkeleita, minkä vuoksi näytteet oli tarpeen suodattaa ennen uuttua. Suodattamaton näyte tukkii SPE-patruunan hyvin helposti. Suodatus toteutettiin imusuodatuksena vesisuihkupumpun avulla ja suodatintyypiksi valittiin lasikuitusuodatin (ks. liite 1, kuva A).

Lasikuitusuodatus testattiin spiikatulla Milli-Q-vedellä ja tulos oli, että suodatus ei pidätä analysoitavia yhdisteitä eikä siten aiheuta hävikkiä lopputuloksiin. Tämän varmistuttua lasikuitusuodatus voitiin hyväksyä osaksi esikäsittelytoimenpiteitä.

7.3.2 SPE-patruunan ja eluointilavuuden valinta

Kaikissa raportoiduissa keinotekoisien makeutusaineiden ympäristöanalyysissä on esikäsittelyyn sovellettu kiinteäfaasiuuttua. Suosituin sorbenttimateriaali on ollut Watersin Oasis[®] HLB [2; 3; 13; 14; 31; 33]. Tässä menetelmänkehityksessä päätettiin testata kolmea eri patruunatyyppeä ja valita niistä saatujen tulosten nojalla sopivin adsorbentti. Kokeiltavien patruunoiden valinnassa apuna käytettiin julkaisuissa annettuja tietoja. Testattaviksi käänteisfaasipatruunoiksi valittiin J. T. Bakerin Bakerbond SDB 1 ja Watersin Oasis[®] HLB. Lisäksi testattiin Watersin Oasis[®] WAX -ioninvaihtopatruuna. Käytössä ollut uuttolaitteisto esitellään liitteen 1 kuvassa B.

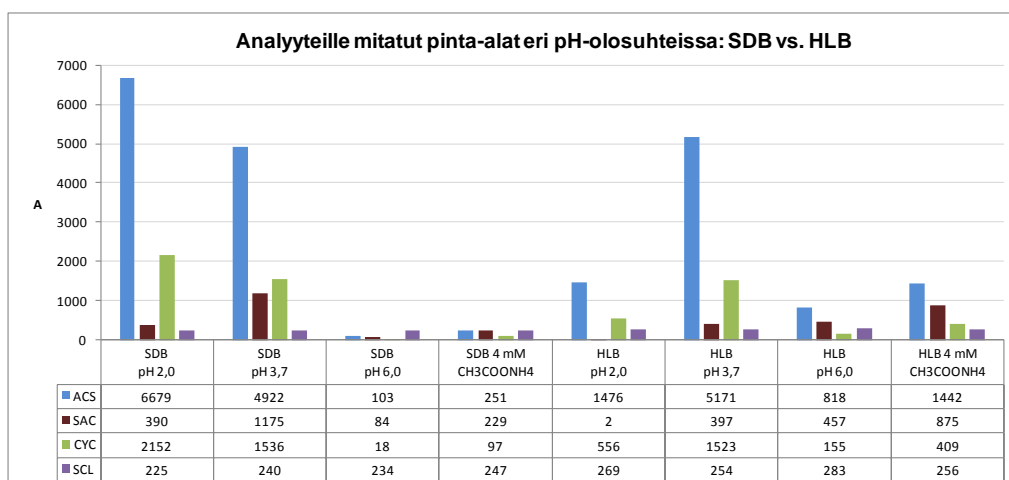
Aiemmissa sukraloosimenetelmissä yleisin patruuna on ollut HLB, mutta sitä ei ole käytetty yhdessäkään monianalyttisessä sovelluksessa. Saksalaisessa seitsemän kohdeyhdisteen menetelmässä patruunaksi oli testien jälkeen valittu SDB [4]. WAX-ioninvaihtopatruunaa haluttiin kokeilla sen vuoksi, että analyteistä kolme on happoja, joiden pK_a -arvot ovat varsin alhaiset (1,6–2,0). Helpon ionisoituvuutensa ansiosta ne saatettaisiin saada tehokkaimmin kerätyksi heikon anioninvaihtosorbentin pintaan. Käänteisfaasiin tarttuminen tapahtuu aina hydrofobisilla vuorovaikutuksilla, joten analyytin tulee olla mahdollisimman täydellisesti neutraalissa muodossaan. Näyteliuoksen tulee siten olla hyvin hapanta, jotta ACS, SAC ja CYC esiintyvät siellä ulkoisesti neutraalissa, protonoituneessa muodossaan.

Selvitettiin, millaisen uuttotilavuuden yhdisteiden eluointi kustakin patruunasta vaatii. Patruunoihin lisättiin standardia suoraan adsorbentin päälle (ACS, SAC ja CYC 90 ng, SCL 450 ng). SDB- ja HLB-patruunoista eluointiin 3 ml:n MeOH-fraktiot aina 12 ml:aan asti. WAX-ioninvaihtopatruuna pestiin ennen

eluoitua 2 % HCOOH (aq) -liuoksella. Patruunasta eluoiitiin ensimmäisenä 6 ml:n MeOH-fraktio, jonka mukana uuttuivat neutraalit yhdisteet. Ionimuotoiset yhdisteet eluoiitiin 1 % NH₃ (MeOH) -liuoksella neljässä 3 ml:n erässä.

Kaikki patruunoista kerätyt fraktiot haihdutettiin kuiviin, minkä jälkeen liuottimiksi lisättiin 1 ml vettä ja näytteet analysoitiin UPLC-MS/MS-laitteistolla. Tuloksena oli, että suurin osa yhdisteistä eluoiutui kaikista patruunoista fraktiossa 0–3 ml ja jonkin verran vielä välillä 3–6 ml. Menetelmässä käytettäväksi uuttoliuottimen tilavuudeksi päätettiin 6 ml. Analyyteistä SCL on niin stabiili, että se pysyy neutraalina eri pH-olosuhteissa. Se eluoiutui WAX:sta MeOH-fraktiossa, kun muut yhdisteet puolestaan uuttuivat NH₃/MeOH-fraktioon. Koska ensisijaisena tavoitteena oli kehittää menetelmä, jossa kaikki analysoitavat yhdisteet ovat samassa uuttofraktiossa, päätettiin WAX-ioninvaihtopatruuna hylätä potentiaalisten vaihtoehtojen joukosta.

Testausta jatkettiin SDB:n ja HLB:n välillä. Seuraavana vertailtiin yhdisteiden pidättymistä patruunoihin eri pH-olosuhteissa. Testinäytteenä käytettiin Milli-Q-vettä, johon spiikattiin SCL:sta pitoisuus 0,75 ng/ml ja muista yhdisteistä 0,15 ng/ml. Näytettä uutettiin jokaisen patruunan läpi 100 ml ja uutteen lopputilavuudeksi haihdutuksen jälkeen tuli 1 ml. Testatut pH:t olivat 2,0; 3,7 ja 6,0, joista viimeinen arvo on Milli-Q-veden pH ilman happamuuden säätöä. Samassa testisarjassa oli mukana myös näyte, johon lisättiin 4 mM-pitoisuus ajoliuoksissa optimaaliseksi todettua ammoniumasetaattia. Lisäksi analysoitiin nollanäyte, joka osoitti, että menetelmän materiaalit eivät sisällä mitään kontaminaation lähteitä. Koesarjassa saadut tulokset esitetään kuvassa 2.

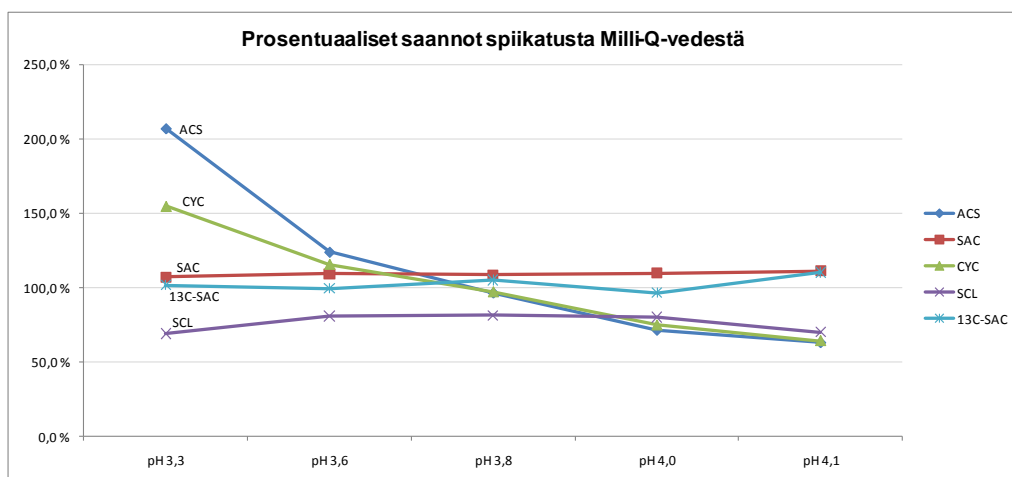


Kuva 2. Analyyttien pidättäytymisen pH-riippuvuus SDB- ja HLB-patruunoissa

Testitulokset osoittivat, että SCL:n kannalta kumpikin patruuna ja kaikki testatut pH-olosuhteet olivat mahdollisia. ACS:n ja CYC:n kannalta parhaalta vaihtoehdolta vaikutti SDB-patruuna pH:ssa 2,0. Kuitenkin SAC:n pinta-ala näissä olosuhteissa jäi selvästi pienemmäksi kuin saman patruunan pH:ssa 3,7. Tulokset osoittivat myös, että uutettava näyte ei ainakaan voi olla pH-säätämätön (pH 6,0) ja että $\text{CH}_3\text{COONH}_4$:lla ei käänteisfaasillisessa SPE-patruunassa ole yhtä tehokasta adsorptiota parantavaa vaikutusta kuin LC-laitteiston käänteisfaasikolonissa. HLB:n kohdalla $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tosin jonkin verran paransi tulosta pH-säätämättömään näytteeseen nähden toisin kuin SDB-patruunalla. Tämän testikierroksen antamien tietojen perusteella päädyttiin valitsemaan menetelmässä käytettäväksi uuttopatruunaksi SDB, jonka osalla olosuhteiden optimointia jatkettiin yksityiskohtaisemmalla tasolla.

7.3.3 Näytteen pH:n optimointi

Kuvan 2 vertailun perusteella ajateltiin, että kaikkien analyyttien saannon kannalta sopivin näytteen pH olisi välillä 3–4, koska SAC:n pinta-ala jäi niin pieneksi pH:ssa 2,0. Tämän vuoksi saantokokeita, joissa oli myös kalibrointi mukana, toteutettiin SDB-patruunalle aluksi vain pH-alueella 3–4. Testimatriisina oli spiikattu Milli-Q, jossa natiivianalyyttien joukkoon lisättiin tässä vaiheessa ensimmäistä kertaa surrogaatti ^{13}C -SAC. Tuloksena saatiin kuvan 3 mukaiset saannot.



Kuva 3. Analyyttien saannot SDB-patruunalla Milli-Q-matriisista (IDMS ei käytössä)

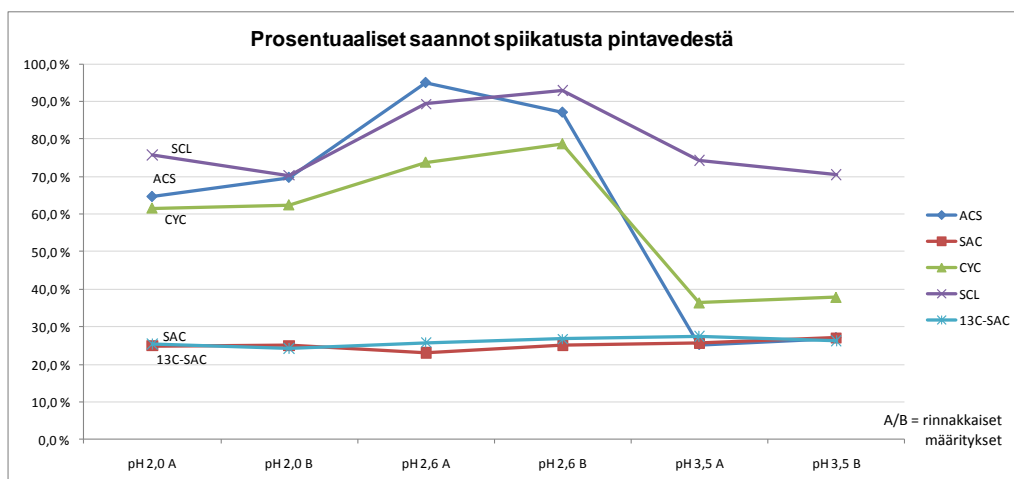
Kuvassa 3 esitetyt tulokset olivat ensi näkemältä varsin hyviä, koska useimpien analyyttien saannot lähentelivät 100 prosenttia. Tuloksia ei kuitenkaan voitu pitää luotettavina, koska pH:ssa 3,3 ACS:lle ja CYC:lle saatiin epärealistisen suuret saannot: 150 % ja jopa yli 200 %. Tästä voitiin päätellä, et-

tä nämä mittaustulokset eivät voineet kuvata todellista tilannetta analyyttien pidättäytymisestä SPE-patruunan adsorbenttifaasiin. Nollakokeen perusteella tiedossa oli, että esikäsittelyprosessi ei sisältänyt mitään kontaminaationlähteitä, ainoaksi virhelähteeksi siten rajautui laiteanalyytin mittausprosessi. Koska ACS:n saannoksi tuli jopa yli 200 %, selvää oli, että sille detektoitu mittaussignaali oli vähintään kaksi kertaa liian suuri.

Kalibroitestien yhteydessä havaittiin, että ACS:n, SAC:n ja CYC:n vaste pitoisuuteen nähden ei käyttäytynyt riittävän lineaarisesti silloin, kun mittauksessa ei ollut mukana instrumentaalisia ja matriisiperäisiä häiriöitä korjaavia deuteroituja standardeja. Myös kaikki kuvan 3 tulokset oli mitattu ja kvantitoitu nimenomaan ilman näitä standardeja. Ainoastaan SCL:n saanto saattoi tässä testisarjassa olla oikean suuntainen, koska kalibroitua testattaessa sen signaali todettiin erittäin lineaariseksi myös ilman instrumenttistandardia.

Optimoinnin luotettavuuden kannalta välttämätöntä olisi ottaa deuteroidut standardit mukaan menetelmänkehitykseen jo mahdollisimman varhaisessa vaiheessa. Testauksen luotettavuutta päätettiin lisätä myös siten, että testimatriisina ryhdyttiin käyttämään Päijänne-tunnelista peräisin olevaa pintavettä, joka taustamatriisiltaan on samankaltainen kuin menetelmällä tutkittavat aidot pintavesinäytteet olisivat.

Kuvan 3 tulokset hylättiin epäluotettavina. SDB-patruunan optimi-pH tuli selvittää uudella koesarjalla. Aiempia tuloksia voitiin pitää siinä mielessä oikean suuntaisina, että lähempänä 4:ää olevat pH-arvot pystyttiin rajaamaan optimoinnin ulkopuolelle. Kuvassa 3 varsinkin ACS:n ja CYC:n vasteet nousevat kohti alempia pH-arvoja, joten testattavaksi alueeksi valittiin pH 2,0–3,5. Testinäytteenä käytettiin Päijänne-pintavettä, joka nollakokeen mukaan ei luonnostaan sisältänyt lainkaan tutkittavia yhdisteitä. Testinäytettä spikattiin SCL:lla pitoisuuteen 145 ng/ml ja muilla natiiviyhdisteillä sekä ¹³C-SAC-surrogaatilla 30 ng/ml. Juuri ennen injektiota lisättävien standardien pitoisuudet olivat *d*-ACS:llä ja *d*-CYC:llä 25 ng/ml ja *d*-SCL:lla 125 ng/ml. Jokaisessa testattavassa pH:ssa toteutettiin kaksi rinnakkaisnäytettä ja uuttotilavuus sekä konsentrintikerroin oli sama kuin kahdessa edellisessä kokeessa (100 ml → 1 ml). Tuloksena saatiin kuvan 4 mukaiset saannot.



Kuva 4. Analyyttien saannot SDB-patruunalla pintavesimatriisista (IDMS käytössä)

Saantojen suuruusluokka oli kaikkien analyttien osalta realistinen, ja voitiin todeta deutoitujen standardien korjanneen mittalaite- ja matriisiperäisiä häiriöitä tehokkaasti. Instrumentaalisen standardin käyttö osoittautui välttämättömäksi niin näytemittauksissa kuin kalibroinnissakin.

Kuvan 4 koesarjan tuloksista voitiin tehdä seuraavat päätelmät näytteen pH:n ja SPE-uuton saannon välisestä riippuvuudesta: SAC:n ja SCL:n saantoon pH ei juurikaan vaikuta. ACS:n ja CYC:n saantoon pH:lla on olennainen vaikutus – molempien kannalta optimaalisimmaksi uutto-pH:ksi arvioitiin saatujen tulosten perusteella $2,5 \pm 0,1$. Tässä pH:ssa analyyteistä kolmen saanto ylitti 70 %, jota orgaanisessa jäätymätason analytiikassa voidaan pitää hyvänä saantoprosenttina. ACS:n ja SCL:n kohdalla päästiin keskimäärin jopa 90 % tasolle CYC:n jäädessä noin 75 %:iin. Koesarjassa määritettyjen rinnakkaisten näytteiden välillä vallitsi hyvä toistettavuus.

SAC:n ja sen massaleimatun vastineen ^{13}C -SAC:n saannot olivat keskimäärin 26 %. Hajonnat testinäytteiden välillä olivat hyvin pieniä pH-olosuhteiden muuntelusta huolimatta. SAC on happo, jonka adsorptiossa pitäisi näkyä jonkinlainen muutos, kun ympäristön pH:ta varioidaan pK_a :n läheisyydessä. ACS- ja CYC-hapoilla muutos oli ilmeinen. Ero voi kuitenkin selittyä esimerkiksi sillä, että SAC:n pK_a on analysoitavista yhdisteistä kaikkein alhaisin – vain 1,6, kun ACS:lla ja CYC:lla se on noin 2.

Saantona SAC:n 26 % on niin matala, että massaleimatun vastineen saannolla korjattuna tulokset ovat tarkkuudeltaan semikvantitatiivisia. ^{13}C -SAC:n saanto vastaa hyvin tarkasti SAC-natiiviyhdistettä. Heikosta saannosta huolimatta ^{13}C -SAC-surrogaatin tunnetun saannon avulla SAC:sta on mahdollis-

ta antaa melko oikeansuuntainen tulos. Ainoa käytettävissä oleva hiilileimat-
tu surrogaatti ei vastannut muiden analyyttien saantotasoa, eikä niitä siten
voida saantokorjata lainkaan. IDMS-tekniikan tarjoama hyöty tulee menetel-
mässä tällöin vain osittain käyttöön. Tilannetta voisi yrittää parantaa siten,
että jokin deuteroiduista instrumenttistandardeista siirrettäisiin surrogaatiksi
 ^{13}C -SAC:n rinnalle.

7.3.4 Uuttotilavuus ja muut SPE:n saantoon vaikuttavat tekijät

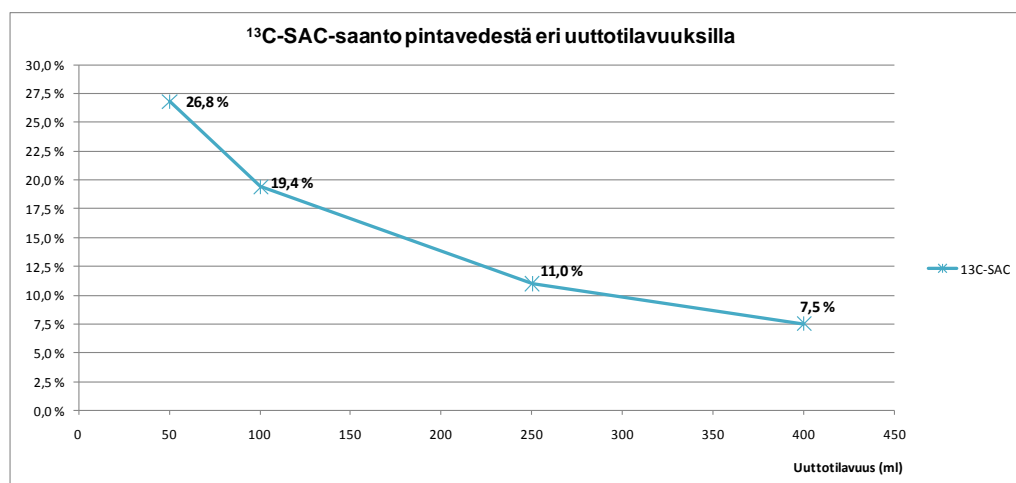
Näytteen lisäämisen jälkeen SPE-patruuna yleensä pestään sopivalla liuot-
timella tai liuotinseoksella, jotta mahdollisimman suuri osa taustakomponen-
teista saadaan poistetuksi patruunasta ennen analyyttien eluointia. Pesuliu-
oksina kokeiltiin pH-säätämätöntä Milli-Q- H_2O :ta, 2 % HCOOH :a (aq) ja
4 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$:a (aq). Kaikkien testattujen pesuliuosvaihtoehtojen to-
dettiin heikentävän varsinkin ACS:n saantoa merkittäväällä tavalla. Kehitys-
työn yhteydessä ei onnistuttu löytämään pesuliuosta, joka ei olisi vaikuttanut
haitallisella tavalla menetelmän saantoon.

Testattiin myös, kannattaako uuttopatruuna kunnostaa neutraalin veden si-
jaan 2 %:lla HCOOH :lla (aq), jonka pH on 2. Hapan kunnostus paransi
ACS:n saantoa jonkin verran, eikä siitä muillekaan analyyteille haittaa ollut,
joten se päätettiin sisällyttää menetelmän lopulliseen versioon. Lisäksi näyt-
teistä yritettiin poistaa poolittomia häiriötekijöitä väkevöidyn uutteen heksaa-
niuutolla, mutta sillä ei havaittu olevan mitään vaikutusta.

Analyyttien, varsinkin SAC:n, adsorptiota SDB-patruunaan yritettiin tehostaa
ulosuolauksella eli lisäämällä näytteeseen NaCl :a, jotta näyteveden lisään-
tynyt polaarisuus ajaisi määritettävän orgaanisen aineksen tehokkaasti ad-
sorbenttifaasin pintaan. Suolakäsittely ei kuitenkaan parantanut menetelmän
saantoa, koska suolapitoisten näytteiden jälkeen patruuna oli pakko pestä
vedellä, minkä tiedettiin heikentävän saantoa. Patruunan pesusta ja kuiva-
uksesta huolimatta väkevöityyn uutteeeseen jäi analyysilaitteeseen injektoin-
nin kannalta liikaa NaCl -jäämiä. Yhdestä suolapitoisesta uutteesta mittauk-
set silti toteutettiin, eikä tuloksena saatu aiempaa suurempia saantoja.

Uuttotilavuuden vaikutusta sakariinin saantoon tutkittiin toteuttamalla koesar-
ja, jossa uutettiin Etelä-Suomen alueelta peräisin olevaa pintavettä tilavuu-
det 50 ml, 100 ml, 250 ml ja 400 ml. Testinäytteitä spiikattiin ^{13}C -SAC-
standardilla siten, että väkevöityjen uutteen pitoisuudeksi tuli 25 ng/ml

100 %:n saantotasolla. Jokaisen uutteen lopputilavuutena haihdutuksen ja veden lisäyksen jälkeen oli 500 µl. Tuloksena saadut ^{13}C -SAC:n prosentuaaliset saannot esitetään kuvassa 5 uuttotilavuuden funktiona.



Kuva 5. ^{13}C -SAC-saannon ja uuttotilavuuden välinen riippuvuus

Kuvaan 5 piirretty käyrä osoittaa ^{13}C -SAC:n saannon paranevan huomattavasti, kun patruunan läpi virtaavaa vesimäärää pienennetään. Saantoprosentti laski uuttotilavuuden kasvaessa, koska mitä enemmän patruunan läpi uuton aikana virtaa vettä, sitä suurempi osa määritettävistä molekyyleistä eluoituu veden mukana suoraan jätteisiin. Tilannetta voisi mahdollisesti parantaa käyttämällä sellaista SPE-patruunaa, jossa on suurempi adsorptiopinta-ala eli enemmän adsorbenttimateriaalia kuin kehitettyyn menetelmään valitun SDB-patruunan 200 mg. Koesarjassa saatujen tulosten perusteella menetelmän uuttotilavuudeksi valittiin 50 ml.

Prosentuaalinen saanto 50 ml:n uuttotilavuudella jäi tässä koesarjassa likimain samalle tasolle (26–27 %) kuin aiemmin pH-olosuhteiden optimoinnin yhteydessä 100 ml:n uutolla (kuva 4, s. 38). Nyt saanto 100 ml:n uuttotilavuudella oli vain noin 20 %. Kyse voi olla satunnaisvaihtelusta, mutta todennäköisimmin ero selittyy sillä, että testisarjojen näytematriisi ei ollut täysin sama. Kummankin koesarjan näyte oli pintavettä, mutta erilaatuista sellaista: pH-testauksessa näytteenä oli Päijänne-tunnelin vesi, kun uuttotilavuustestauksessa käytettiin Etelä-Suomen alueelta peräisin olevaa jokivesinäytettä. Tuloksessa siten mitä todennäköisimmin näkyy se, että tiheästi asutun alueen jokivesi on saannon kannalta jonkin verran haastavampi matriisi kuin koostumukseltaan melko puhdas Päijänne.

7.3.5 Haihdutus ja sitä seuraavat toimenpiteet

Kun analyytit on eluoitu SPE-patruunasta 6 ml:lla metanolia, on seuraavana työvaiheena liuottimen vaihto vedeksi ja pienempään tilavuuteen konsentroidi. Metanoli poistetaan haihduttamalla uute kuiviin. Orgaanisten yhdisteiden määritysmenetelmiin tyypillisesti kuuluva liuottimen haihdutus saattaa aiheuttaa hävikkiä saantoon. Ennen lopullisen haihdutustekniikan valintaa tehtiin vertailukokeita sentrifugaalihaihdutuksen ja normaalipaineessa toteutettavan typpihaihdutuksen välillä. Saantoon vaikuttavia eroja haihdutustekniikoissa ei havaittu. Analyyttien korkeiden kiehumispisteiden vuoksi konsentroidin mahdollinen vaikutus saantoon ylipäättään on pieni verrattuna SPE-uuton yhteydessä tapahtuvaan hävikkiin.

Menetelmään sisällytettäväksi haihdutustavaksi valittiin sentrifugaalihaihdutus, koska se on typpihaihdutusta moninkertaisesti nopeampi tekniikka. Sentrifugaalihaihdutuksessa (ks. liite 1, kuva C) liuotin haihdutetaan lämmön avulla alipaineessa siten, että näyte pyörii suurella nopeudella roottorin akselin ympäri kuten sentrifugissa. Haihduttimen pyörimisnopeus oli 2500 rpm, vakuumi alimmillaan 12 mbar ja maksimilämpötila 35 °C.

Kuivaksi haihdutettuun koeputkeen lisättäväksi vesitilavuudeksi valittiin menetelmän lopullisessa versiossa 190 µl. Tähän tulee lisätä 10 µl metanoliin laimennettua instrumenttistandardiseosta, joten näytteen lopputilavuudeksi tuli 200 µl. Uuttotilavuudella 50 ml näytteen pitoisuudesta saadaan 250 kertaa alkuperäistä väkevämpi. Konsentroidikertoimesta haluttiin niin suuri kuin 50 ml uuttotilavuuden puitteissa oli mahdollista, jotta menetelmän toteutamis- ja määritysrajat saataisiin riittävän mataliksi.

Liuottimen vaihdon seurauksena uutuksessa saattaa olla kiinteää ainesta, joka on liukoista metanoliin mutta ei veteen. Väkevöidyt uutteen tulee instrumenttistandardin lisäyksen jälkeen sentrifugoida. Analyysilaitteeseen injektitava näyte ei saa sisältää kiinteitä partikkeleja. Sentrifugoinnin jälkeen näyte on valmis UPLC-MS/MS-laitteistolla analysoitavaksi.

Massaleimatuista standardeista ¹³C-SAC:lle, d-ACS:lle ja d-CYC:lle optimointitesteissä käytetty pitoisuus 25 ng/ml osoittautui sopivaksi. d-SCL:lle aluksi käytössä ollut testipitoisuus 125 ng/ml ei ollut riittävä, vaan sen tulee olla vähintään 225 ng/ml, jotta piikki saadaan erottumaan hyväksyttävällä S/N-suhteella hankalistakin näytematriiseista.

7.4 Sisäinen laadunohjaus

Jokaiseen rutiinikäyttöön päätyvään analyysimenetelmään tulee menetelmänkehityksen yhteydessä suunnitella sisäiset laadunohjaustoimenpiteet, joilla voidaan taata tulosten pysyminen hyväksyttävän mittausepävarmuuden rajoissa pitkällä aikavälillä. Tässä opinnäytteessä kehitetyssä menetelmässä keskeisimmät laadunohjaustoimet ovat saantoprosentin määrittäminen sekä rinnakkais-, kontrolli- ja nollanäytteiden analysointi.

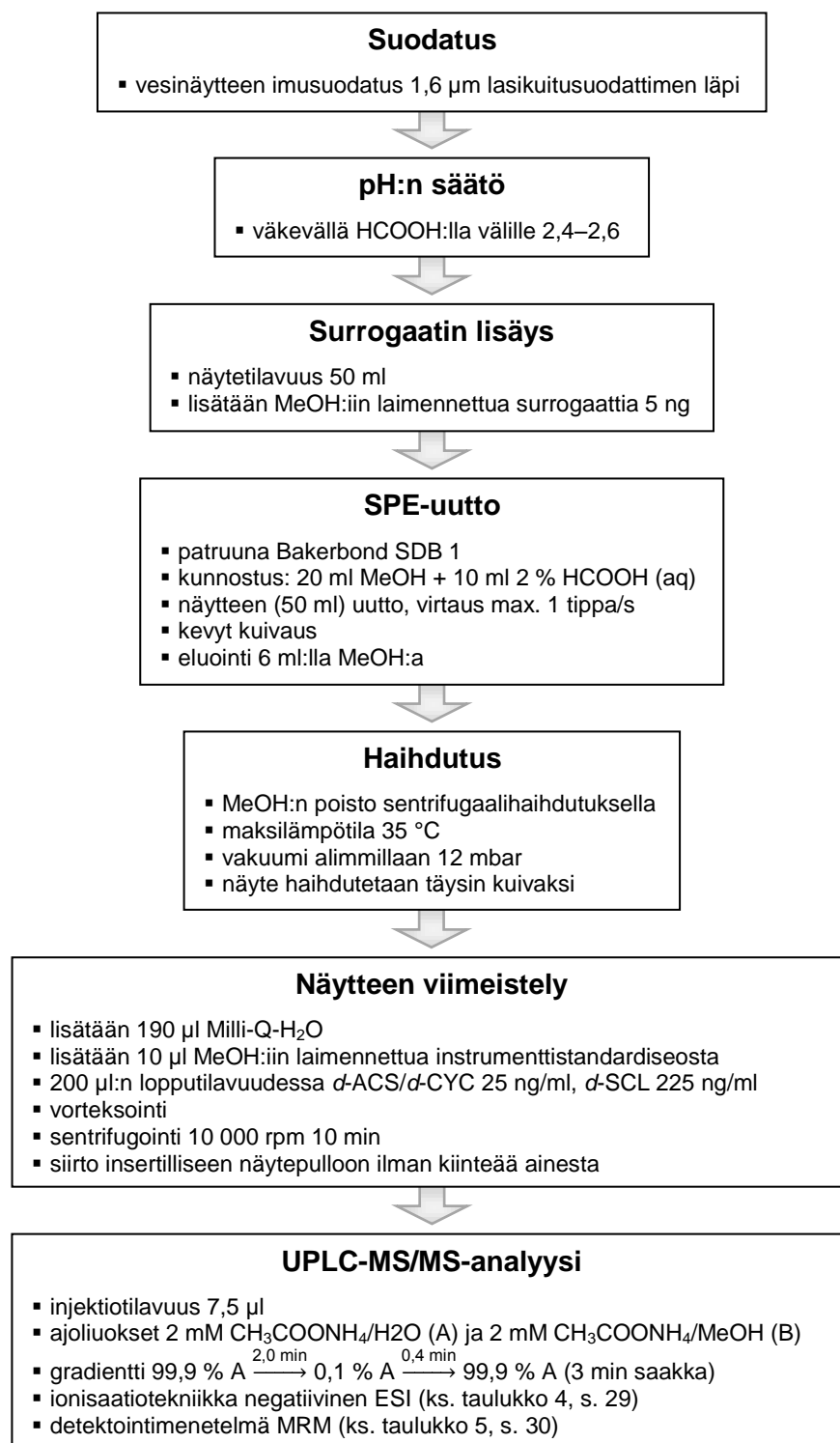
Menetelmänkehityksen yhteydessä tehdyt nollakokeet osoittivat, että käytössä olevat materiaalit eivät tuota tuloksiin kontaminaatiota. Kaikki astiat ja välineet tulee ennen käyttöä huuhdella metanolilla. Analyysilaitteella eri näytteiden välissä ajetaan yksi metanoli-injektio – tai erityisen väkevillä ja/tai likaisilla näytteillä jopa useampia, jotta voidaan varmistua kolonnin puhtautudesta. Suositeltavaa olisi ajaa puhdistusinjektio myös eluentin toisella liuotinkomponentilla eli vedellä. Korkeissa ACS-pitoisuuksissa ilmeni kolonnin puhdistumisessa joitakin ongelmia, joten kolonnin puhtautta tulee valvoa seuraamalla liuotininjektioista mitattua vastetta.

Yhdistekohtaisten saantoprosenttien määrittäminen kannalta IDMS-tekniikasta ei kehitetyssä menetelmässä vielä pystytty saamaan niin suurta hyötyä kuin sillä parhaimmillaan voisi olla. Ainoa käytössä ollut surrogaatti vastasi vain yhden tutkittavan yhdisteen (SAC) saantotasoa, joka jäi 27 %:iin. Analyysin määrittämisprosessissa kokema hävikki pystytään kvantitatiivisesti luotettavalla tavalla huomioimaan lopputuloksissa, kun surrogaatin saantoprosentti on riittävän korkea, mieluiten ≥ 70 %. Menetelmän toiseksi surrogaatiksi tulisi saada yhdiste, jonka saanto olisi rinnastettavissa ACS:iin, CYC:iin ja SCL:iin. Saantoprosentit olivat melko lähellä toisiaan, joten näille yhdisteille yhteisen surrogaatin käyttö saattaisi olla mahdollista. Tulevaisuudessa olisikin syytä tutkia, kuinka *d*-ACS, *d*-CYC tai *d*-SCL toimisi menetelmässä surrogaattina.

Menetelmän suorituskykyä tulee rutiinimääritysten ohessa seurata sekä esikäsittelyn että laitteiston toistettavuuden kannalta. Paras keino tähän on analysoida jokaisen näytesarjan mukana pitoisuudeltaan tunnettu kontrollinäyte, jonka matriisi on samantyyppinen kuin tutkittavilla näytteillä. Kontrollitulokset kirjataan kontrollikorttiin, joka toteutetaan esimerkiksi keskiarvo- eli \bar{x} -korttina. Lisäksi on suositeltavaa, että jokaisesta tutkittavasta näytteestä toteutetaan ainakin kaksi rinnakkaista määrittystä.

7.5 Yhteenveto menetelmän toteutuksesta

Kuvassa 6 esitetään kooste kehitetyn menetelmän esikäsittelyn ja mittausten toteutuksesta. Tarkempi yhteenveto, johon sisältyvät muun muassa kalibrointiliuoksissa käytetyt pitoisuudet, tärkeimmät väline- ja laitetekniset yksityiskohdat sekä ohjeita tulosten käsittelyyn, on löydettävissä liitteestä 5.



Kuva 6. Makeutusaineille kehitetyn analyysimenetelmän keskeisimmät työvaiheet

7.6 Arvio menetelmän määrittämisrajoista

Kalibrointiliuoksista tehtyjen mittausten perusteella arvioitiin, millaisia pitoisuuksia menetelmällä voidaan kvantitoida laitteiston suorituskvyyyn puitteis-
sa. Yhdistekohtaiset määrittämisrajat (LOQ) arvioitiin sen perusteella, mikä kalibrointisuorilla mitatuista pisteistä edustaa alinta pitoisuutta, jonka signaali-
kohinasuhde (S/N) on vähintään 10. Minimipitoisuustasojen valinnassa on
huomioitu myös se, että niiden tulee olla sellaisia, joilla kriteeri $S/N \geq 10$ to-
teutui toistettavasti eri mittauspäivinä. Tällä periaatteella valikoidut rajapitoi-
suudet sekä niitä vastaavat keskimääräiset S/N:t on koottu taulukkoon 6.

Taulukko 6. Menetelmälle laitteiston suorituskvyyyn puitteisissa arvioidut määrittämisrajat

	Matalin kalibrointiliuos pitoi- suus (ng/ml), jossa $S/N \geq 10$	Keskimääräinen S/N^{10}	Saanto (%)	LOQ (ng/l) ¹¹
ACS	0,07	113	90	1
SAC	0,28	61	27	5
CYC	0,30	45	75	2
SCL	1,39	25	90	7

Taulukon oikean laidan LOQ-sarakkeessa määrittämisraja esitetään pitoisuute-
na, joka kvantitoitavassa vesinäytteessä alun perin tulee olla, jos analyytti-
kohtaiset saannot ovat taulukossa ilmoitetun mukaiset ja esikäsittely toteute-
taan siten, että konsentroitokerroin on 250.

Jos LOQ:n kriteeriksi asetetaan $S/N=10$, ovat menetelmän määrittämisrajat to-
dellisuudessa taulukossa 6 ilmoitettuja pitoisuuksia alhaisemmat. Varsinkin
ACS:lla mittauksen herkkyys riittäisi vielä huomattavasti matalampien pitoi-
suuksien kvantitointiin. Teoreettisia minimiarvoja määrittämisraja LOQ:lle
($S/N=10$) ja toteamisraja LOD:lle ($S/N=3$) ei tässä yhteydessä koettu tarkoi-
tuksenmukaisiksi esittää, koska menetelmän lineaarisuutta ei kokeellisissa
mittauksissa osoitettu taulukossa mainittujen pitoisuuksien alapuolelta.

On myös huomioitava, että menetelmän suorituskvyyyn rajat ovat aina mat-
riisikohtaisia. Jos menetelmä otetaan rutiinikäyttöön, tulee kullekin analysoi-
tavalle näytematriisille määrittää omat yhdistekohtaiset raja-arvonsa. Matrii-
silla on olennainen vaikutus muun muassa esikäsittelyn saantoprosenttiin
sekä mittauksen taustakohinan ja ionisuppression voimakkuuteen. Rajat tu-
levat sitä korkeammiksi, mitä haastavampi näytematriisi on kyseessä.

¹⁰ Mittauspisteen keskimääräinen s/n kahden eri päivän mittauksissa, joissa kolme rinnakkaisin-
jektia päivää kohden.

¹¹ Vrt. esim. saksalaismenetelmän LOQ:t (ng/l; s/n=6): ACS 2, SAC 2, CYC 5, SCL 10 [4, s. 1591].

8 LOPUKSI

Kehittämisprosessista haasteellisen ja laajan teki erityisesti se, että menetelmän pystytys aloitettiin tämän opinnäytetyöprojektin yhteydessä aivan alkutekijöistä. Tehtävän laajuuteen ja käytettävissä olleeseen aikaan nähden saavutettua lopputulosta voidaan pitää hyvin onnistuneena. Kehitystyön tuloksena saatiin analyysimenetelmä, jolla asesulfaami-K:lle, syklamaatille ja sukraloosille pintavesinäytteistä määritettävät pitoisuudet edustavat vähintään 75 %:n osuutta näytteen todellisesta pitoisuudesta. Tätä voidaan organisessa analytiikassa pitää varsin kiitettävänä saantona.

Kohdeanalyyteistä vain yhden, sakariinin, saanto jäi tasolle 27 %. Saantoprosenttia yritettiin kasvattaa lukuisin keinoin, ja ainoastaan uuttotilavuuden pienentämisellä oli tilannetta parantava vaikutus. Tulevaisuudessa kannattaisi kokeilla, kuinka SPE-adsorbentin pinta-alan kasvattaminen vaikuttaisi esikäsittelyprosessin saantoon. Jatkossa suositeltavaa olisi testata vielä tarkemmin myös muita adsorbenttimateriaaleja kuin hydrofobista käänteisfaasia.

Menetelmän lopullisen version suorituskky todettiin tarkoitukseensa hyvin soveltuvaksi. Kalibrointi oli lineaarinen, rinnakkaismääritykset toistettavia ja määritysrajoissa päästiin niin alas kuin ympäristömatriisin todellisten pitoisuuksien kannalta on tarpeellista. Sakariinin matala saantokaan ei ole ylittämättömän ongelma: tulos pystytään suuntaa antavasti korjaamaan tasolle 100 % hiilileimatun sakariinin saannolla, jonka osoitettiin olevan matriisista riippumatta sama kuin natiiviyhdisteellä. Koska surrogaatiksi valitun yhdisteen saanto pystyttiin rinnastamaan vain sakariiniin, jatkossa tulisi tutkia myös deuterioitujen standardien käyttöä surrogaatteina.

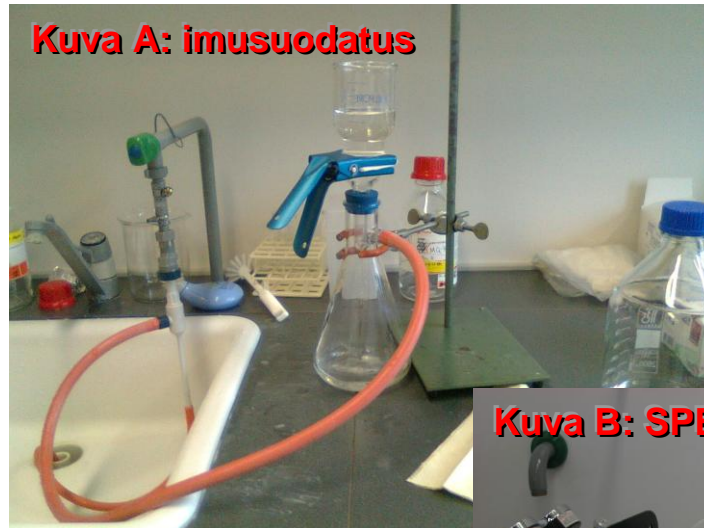
VIITELUETTELO

- [1] Lubick, Naomi, Artificial Sweetener Persists in the Environment. *Environmental Science & Technology* 42 (2008), s. 3125.
- [2] Brorström-Lundén, Eva, ym., Measurements of Sucralose in the Swedish Screening Program 2007 PART I, Sucralose in Surface Waters and STP Samples. IVL Swedish Environmental Research Institute Report B1769. 28.1.2008. [viitattu 29.8.2010]. Saatavissa: <http://www3.ivl.se/rapporter/pdf/B1769.pdf>.
- [3] Green, Norman, ym., Screening of Selected Metals and New Organic Contaminants 2007. Phosphorus Flame Retardents, Polyfluorinated Organic Compounds, Nitro-PAHs, Silver, Platinum and Sucralose in Air, Wastewater Treatment Facilities and Freshwater And Marine Recipients. Norwegian Pollution Control Authority Report 1014/2008. 6.5.2008. [viitattu 29.8.2010]. Saatavissa: <http://www.klif.no/publikasjoner/2367/ta2367.pdf>.
- [4] Scheurer, Marco, ym., Analysis and Occurrence of Seven Artificial Sweeteners in German Waste Water and Surface Water and in Soil Aquifer Treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (2009), s. 1585–1594.
- [5] Dye, Christian, ym., Sucralose – a New Persistent Pollutant in the Environment? Poster. Norwegian Institute for Air Research. 14.5.2007. [viitattu 29.8.2010]. Saatavissa: <http://www.nilu.no/data/inc/leverfil.cfm?id=22461&type=6>.
- [6] Kylin, Henrik, Sucralos finns i vattendrag. *Kemivärlden Biotech med Kemisktidsskrift* 4 (2007), s. 7.
- [7] Reinders, Anke ym., Sugarcane ShSUT1: Analysis of Sucrose Transport Activity and Inhibition by Sucralose. *Plant, Cell and Environment* 29 (2006), s. 1871–1880.
- [8] Vidmark, Maria, Miljöutredning av sukralos. 22.5.2007. [viitattu 29.8.2010]. Saatavissa: http://www.gu.ekol.lu.se/BIOR52/Tillampade_uppdrag_2007/Sukralos.pdf.
- [9] Bydemar, Sofia, ym., Socker i ny sockerfri version – Sukralos är godkänt trots otillräcklig forskning. 2007. [viitattu 30.8.2010]. Saatavissa: http://www.ipd.gu.se/digitalAssets/982/982684_socker.pdf.
- [10] Petersson, Göran, Öppet brev om Sötningsmedlet Sukralos. 2005. [viitattu 30.8.2010]. Saatavissa: <http://www.konsumentsamverkan.se/11verk/kampanj/tillsatser/sukralos/sotningsmedletsukralos.pdf>.
- [11] Ahlborg, Karin, Forskare varnar för katastrof. 1.8.2007 [viitattu 30.8.2010]. Saatavissa: <http://www.aftonbladet.se/kropphalsa/article559646.ab>.
- [12] Celion, Johanna, Sötningsmedel, en serie i fem delar. Del 1. Sukralos. 14.12.2009 [viitattu 30.8.2010]. Saatavissa: <http://reztart.se/blogg/sotningsmedel-en-serie-i-fem-delar-del-1-sukralos>.

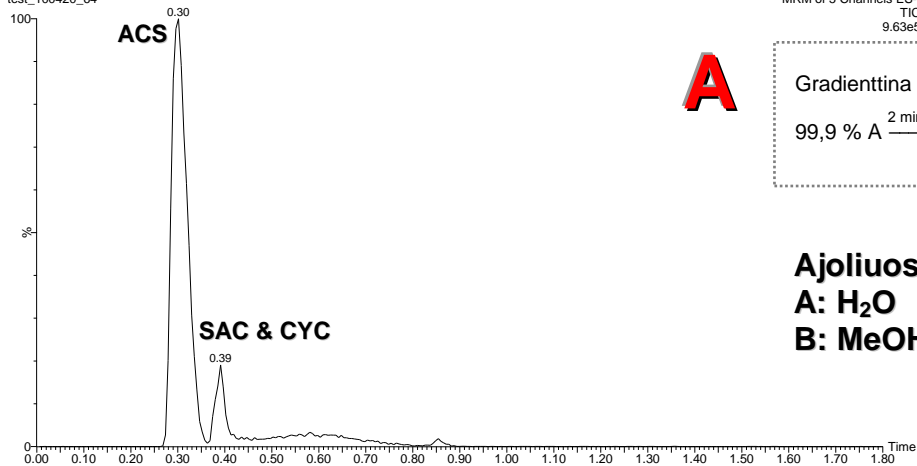
- [13] Brorström-Lundén, Eva, ym., Measurements of Sucralose in the Swedish Screening Program 2007 PART II, Sucralose in Biota Samples and Regional STP Samples. IVL Swedish Environmental Research Institute Report B1795. 27.6.2008. [viitattu 29.8.2010]. Saatavissa: <http://www3.ivl.se/rapporter/pdf/B1795.pdf>.
- [14] Evenset, Anita, ym., Screening of New Contaminants in Samples from the Norwegian Arctic. Silver, Platinum, Sucralose, Bisphenol A, Tetrabrombisphenol A, Siloxanes, Phtalates (DEHP), Phosphororganic Flame Retardants. Norwegian Pollution Control Authority Report 1049/2009. 14.5.2009 [viitattu 31.8.2010]. Saatavissa: <http://www.klif.no/publikasjoner/2510/ta2510.pdf>.
- [15] Adolfsson-Erici, Margaretha, ym., Undersökning av det syntetiska sötningsmedlet sukralos med avseende på eventuella ekotoxikologiska effekter. Stockholms Universitetet Institutionen för tillämpad miljövetenskap ITM-rapport 181. 11.2.2009 [viitattu 30.8.2010]. Saatavissa: http://www.naturvardsverket.se/upload/02_tillstandet_i_miljon/Miljoovervakning/rapporter/miljogift/sukralos_itm.pdf.
- [16] Naturvårdsvärket, Syntetiskt sötningsmedel sprids till miljön. 18.5.2010 [viitattu 31.8.2010]. Saatavissa: <http://www.naturvardsverket.se/sv/Tillstandet-i-miljon/Miljogifter/Organiska-miljogifter/Sa-sprids-miljogifter-i-miljon/Sotningsmedel-sprids-till-miljon/>.
- [17] Labare, Michael P. - Alexander, Martin, Biodegradation of Sucralose, a Chlorinated Carbohydrate, in Samples of Natural Environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12 (1993), s. 797–804.
- [18] Buerge, Ignaz J, ym., Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environmental Science & Technology* 43 (2009), s. 4381–4385.
- [19] Lennart, Kaj, Interlaboratory Comparison on Sucralose. *Norman Network Bulletin* 1 (2009), s. 13–17. 22.12.2009 [viitattu 31.8.2010]. Saatavissa: http://www.norman-network.net/newsletters/newsletter_norman_1a.pdf.
- [20] Hermesetas, Sweeteners in General. 1.9.2010 [viitattu 1.9.2010]. Saatavissa: <http://www.hermesetas.com/data/en/products/sweeteners.php>.
- [21] Finfood ruokatieto, Sokerit ja hunaja. [Viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: <http://opetus.ruokatieto.fi/WebRoot/1043190/sisaltosivu.aspx?id=1072845>.
- [22] Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri, Keinotekoiset makeutusaineet. 10.5.2010 [viitattu 1.9.2010]. Saatavissa: <http://www.hus.fi/default.asp?path=1,28,824,2049,2265,2260,3437,26266,28126>.
- [23] Grice, H. C. - Goldsmith, L. A, Sucralose – An Overview of the Toxicity Data. *Food and Chemical Toxicology* 38/supplement 2 (2000), s. 1–6.
- [24] Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, Sukraloosi. [Viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: <http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/elintarviketietoa/lisaaineet/sukraloosi/>.

- [25] Tate & Lyle, SLENDA® Sucralose. 2010 [viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: <http://www.tateandlyle.com/ingredientsandservices/chooseaningredientorser vice/americas/pages/splenda%C2%AEsucralose.aspx>.
- [26] U. S. Food and Drug Administration (FDA), Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption, Sucralose – Final Rule. 8.12.1999 [viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/cf9947.pdf>.
- [27] European Commission, Opinion: Re-evaluation of Acesulfame K with Reference to the Previous SCF Opinion of 1991. 9.3.2000 [viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out52_en.pdf.
- [28] European Commission, Opinion on Saccharin and Its Sodium, Potassium and Calcium Salts. 2.6.1995 [viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm7/out26_en.pdf.
- [29] European Commission, Revised Opinion on Cyclamic Acid and Its Sodium and Calcium Salts. 9.3.2000 [viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out53_en.pdf.
- [30] European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on Sucralose. 7.9.2000 [viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf.
- [31] Loos, Robert, ym., Sucralose Screening in European Surface Waters Using a Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry Method. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009), s. 1126–1131.
- [32] Zyglis, Agata, ym., Analytical Methodologies for Determination of Artificial Sweeteners in Foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009), s. 1082–1102.
- [33] Mead, Ralph N, ym., Occurrence of the Artificial Sweetener Sucralose in Coastal and Marine Waters of the United States. *Marine Chemistry* 116 (2009), s. 13–17.
- [34] Sheridan, Robert – King, Thomas, Determination of Cyclamate in Foods by Ultraperformance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* 91 (2008), s. 1095–1102.
- [35] Toronto Research Chemicals Inc, Certificate of Analysis: Acesulfame Potassium. 14.8.2009.
- [36] Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Certificate of Analysis: Saccharin. 13.4.2010.
- [37] Toronto Research Chemicals Inc, Certificate of Analysis: Cyclamic Acid. 11.11.2009.
- [38] Toronto Research Chemicals Inc, Certificate of Analysis: Sucralose. 8.11.2007.
- [39] Toronto Research Chemicals Inc, Certificate of Analysis: Acesulfame-*d*₄ Potassium. 12.8.2009.

- [40] Toronto Research Chemicals Inc, Certificate of Analysis: Saccharin- $^{13}\text{C}_6$. 7.1.2010.
- [41] Toronto Research Chemicals Inc, Certificate of Analysis: Cyclamic Acid- d_{11} . 23.11.2009.
- [42] Toronto Research Chemicals Inc, Certificate of Analysis: Sucralose- d_6 . 16.10.2009.
- [43] Budavari, Susan, ym., *The Merck Index*. 12th edition. Whitehouse Station, NJ, USA: Merck Research Laboratories Division of Merck & Co. Inc. 1996.
- [44] Harris, Daniel C, *Quantitative Chemical Analysis*. 7th edition. W. H. Basingstoke, United Kingdom: Freeman & Co Ltd. 2007.
- [45] Swartz, Michael E, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. *Separation Science Redefined 5* (2005), s. 8–14. 2005 [viitattu 15.9.2010]. Saatavissa: <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articlestandard//lcgc/242005/164646/article.pdf>.
- [46] Jaarinen, Soili - Niiranen, Jukka, *Laboratorion analyysitekniikka*. Helsinki: Edita. 2005.
- [47] Sargent, Mike, ym., *Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS)*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 2002.
- [48] Waters, ACQUITY UPLC Columns. 2010 [viitattu 21.9.2010]. Saatavissa: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513206#>.



scl, cyc, acs ja sac 50 ng/ml + H₂O, 1:9 MeOH/H₂O
test_100420_64



MRM of 5 Channels ES-
TIC
9.63e5

Gradienttina kaikissa grammeissa:

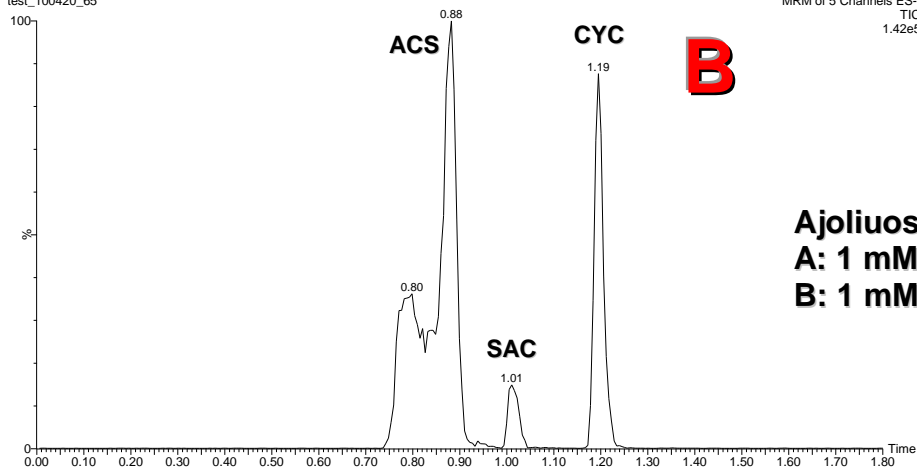
99,9 % A $\xrightarrow{2 \text{ min}}$ 0,1 % A $\xrightarrow{0,4 \text{ min}}$ 99,9 % A

Ajoliuos:

A: H₂O

B: MeOH

scl, cyc, acs ja sac 50 ng/ml + H₂O, 1:9 MeOH/H₂O
test_100420_65



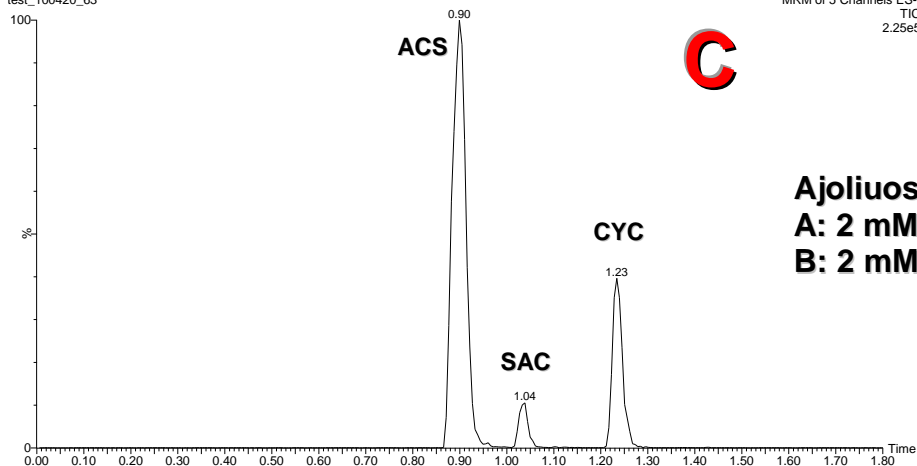
MRM of 5 Channels ES-
TIC
1.42e5

Ajoliuos:

A: 1 mM CH₃COONH₄ / H₂O

B: 1 mM CH₃COONH₄ / MeOH

scl, cyc, acs ja sac 50 ng/ml + H₂O, 1:9 MeOH/H₂O
test_100420_63



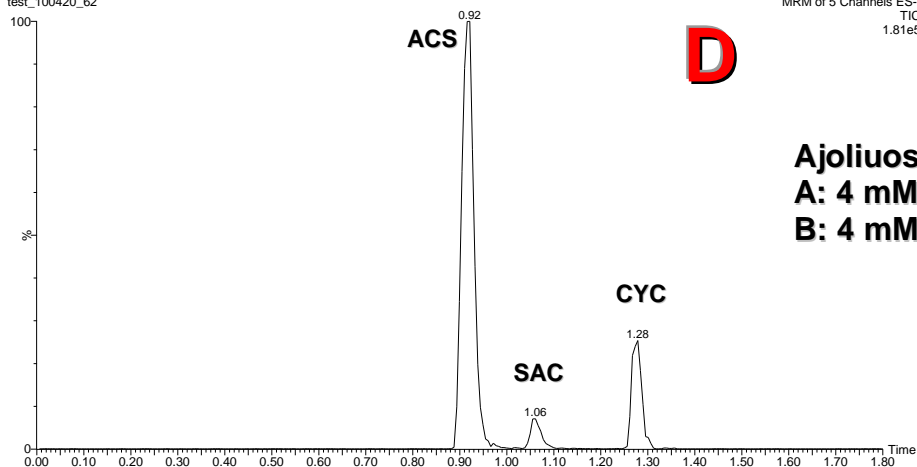
MRM of 5 Channels ES-
TIC
2.25e5

Ajoliuos:

A: 2 mM CH₃COONH₄ / H₂O

B: 2 mM CH₃COONH₄ / MeOH

scl, cyc, acs ja sac 50 ng/ml + H₂O, 1:9 MeOH/H₂O
test_100420_62

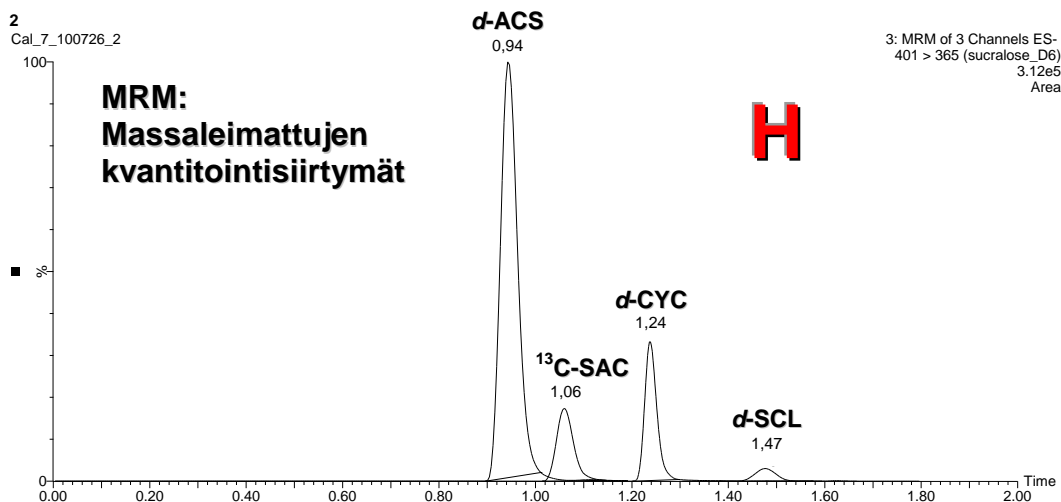
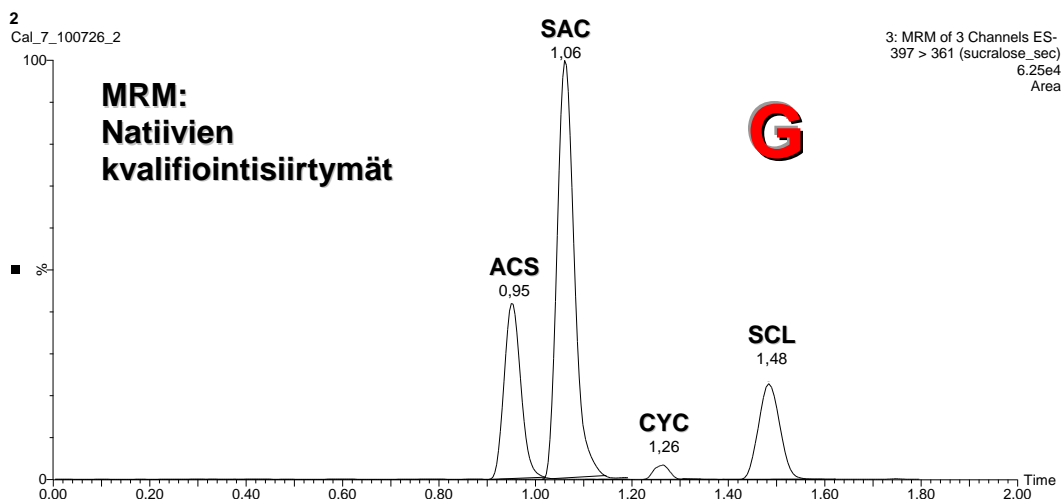
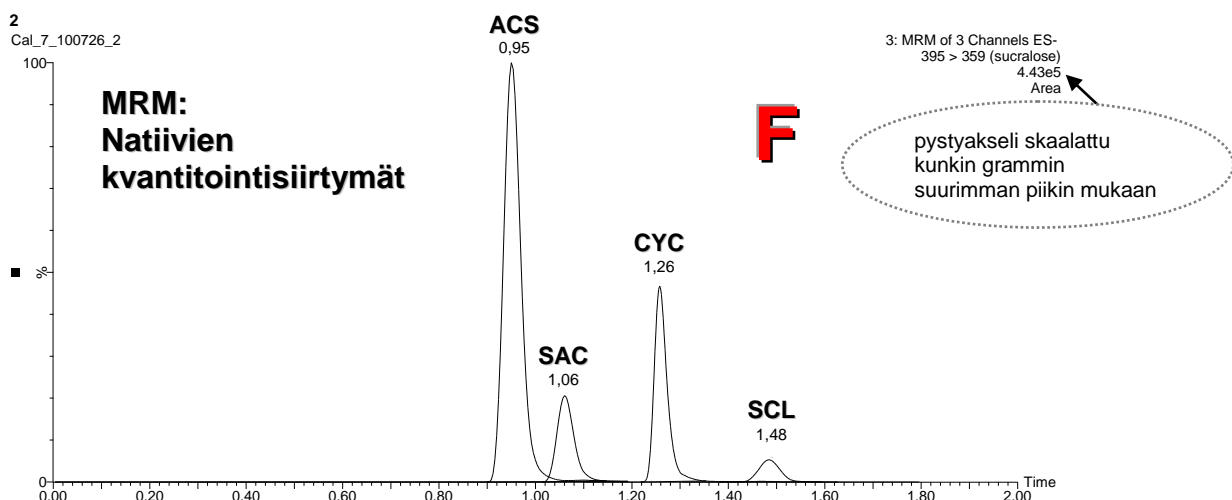
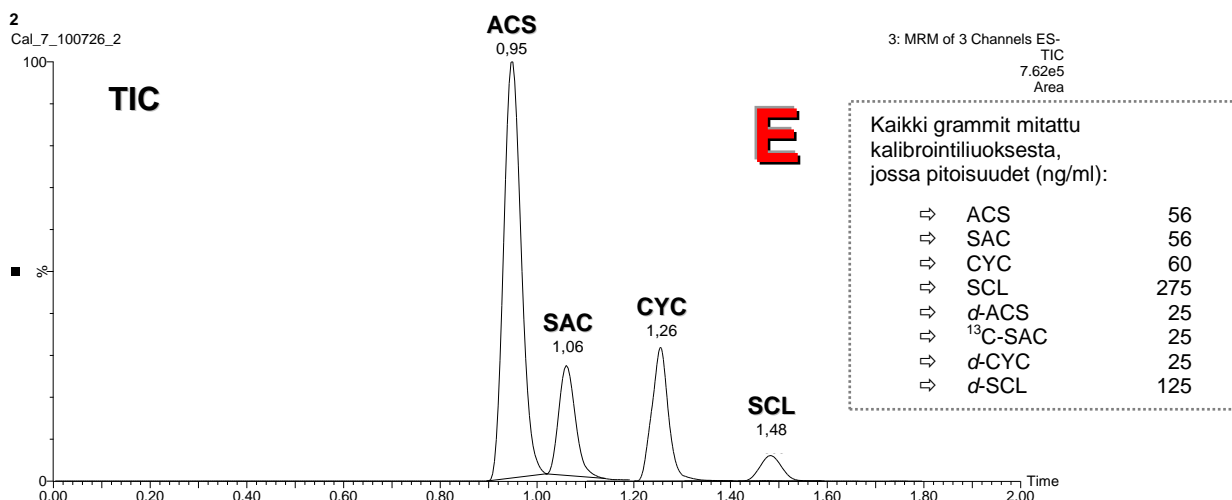


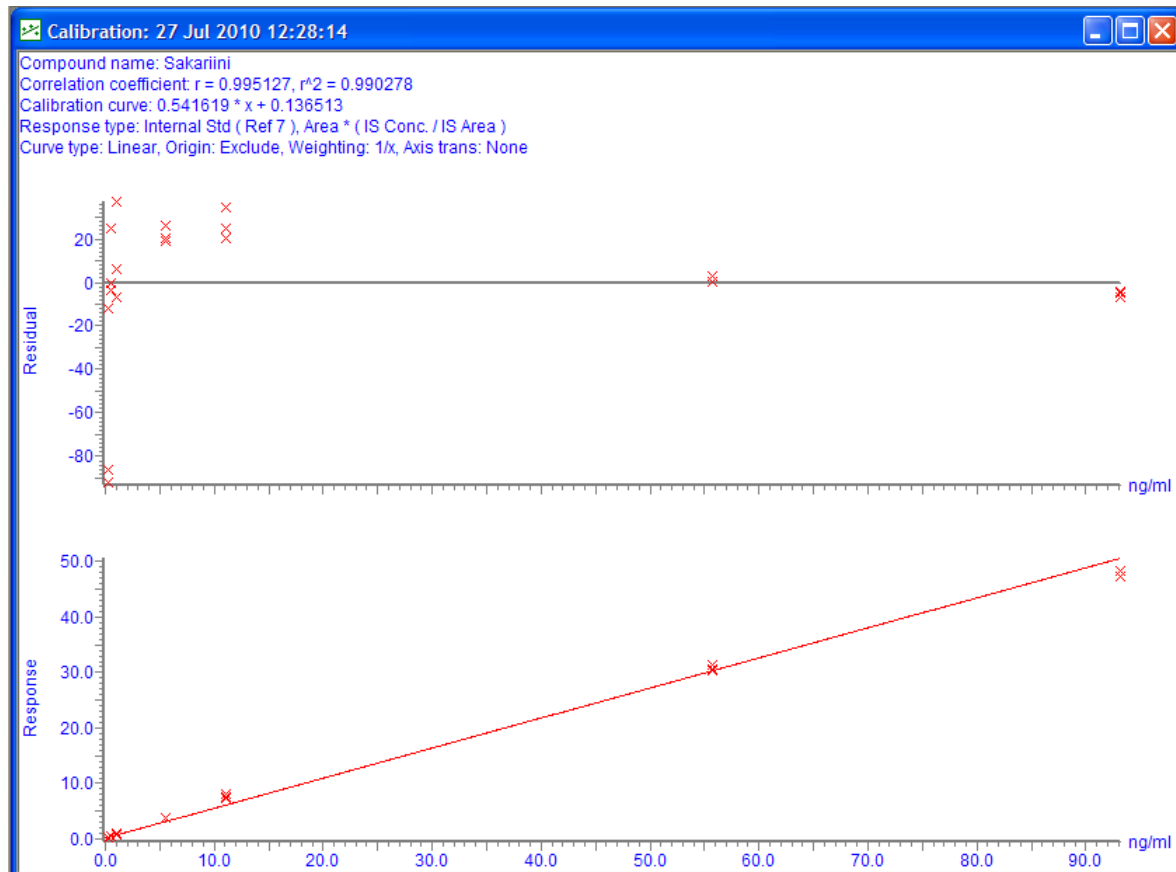
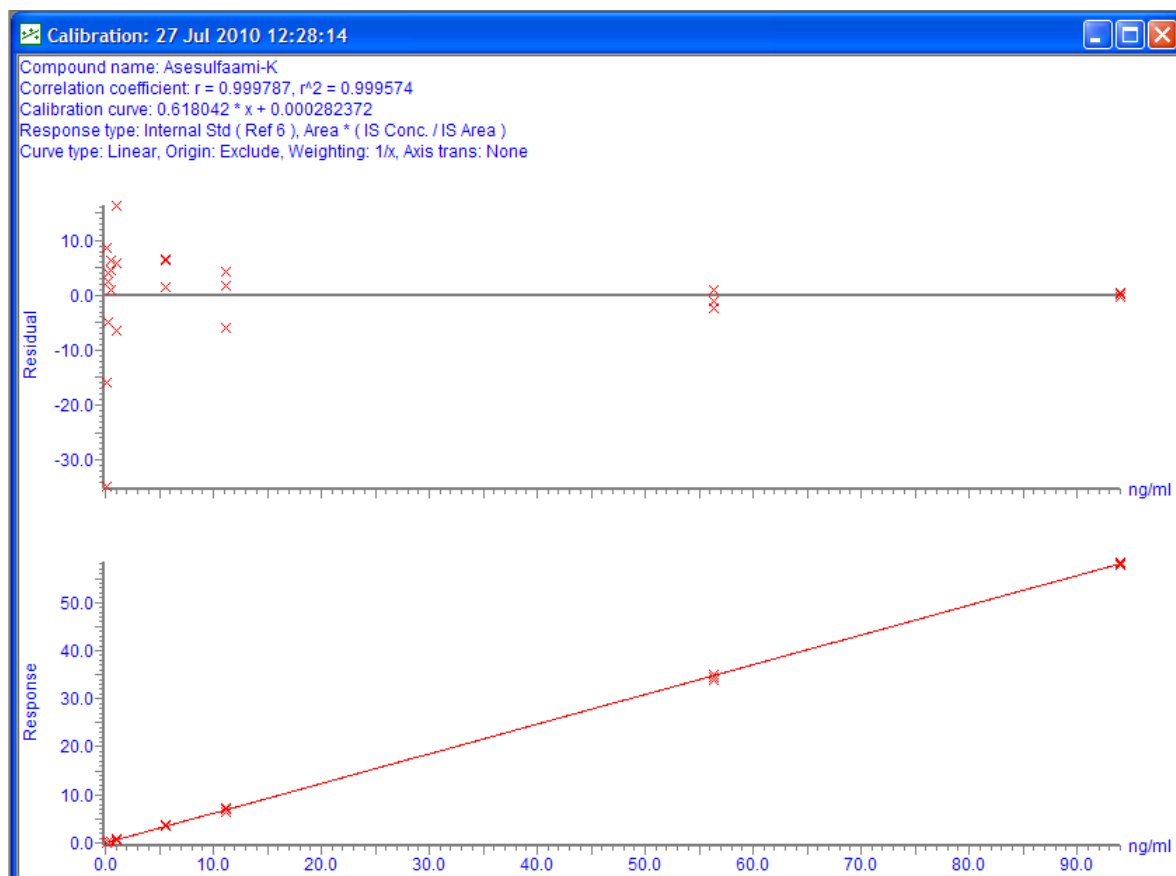
MRM of 5 Channels ES-
TIC
1.81e5

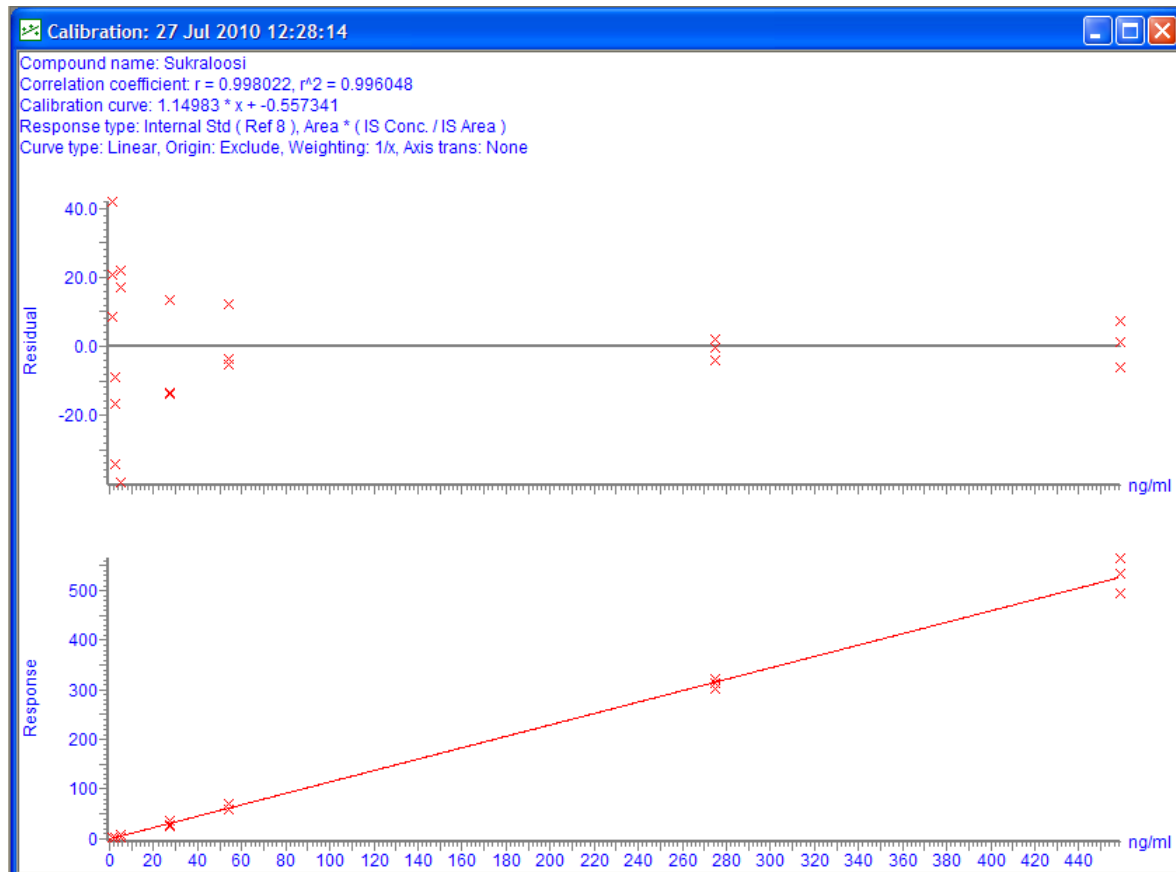
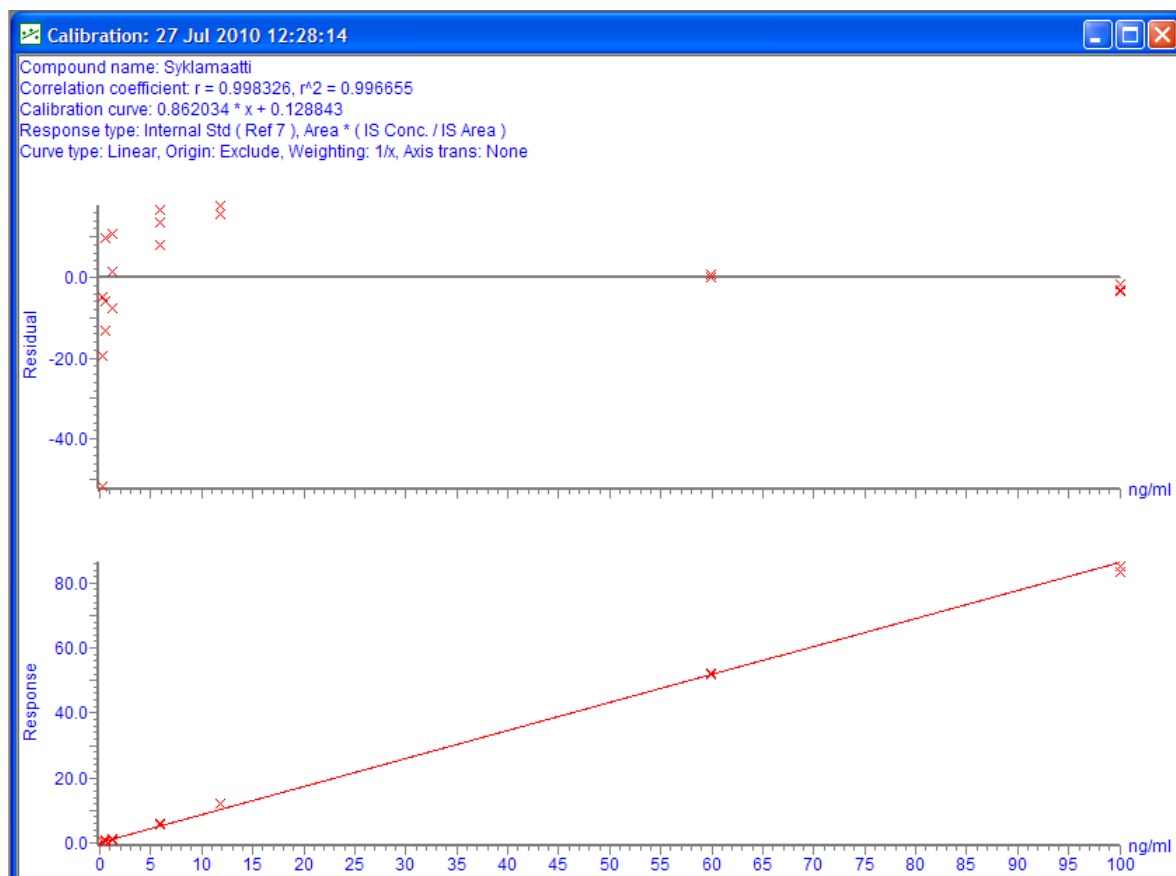
Ajoliuos:

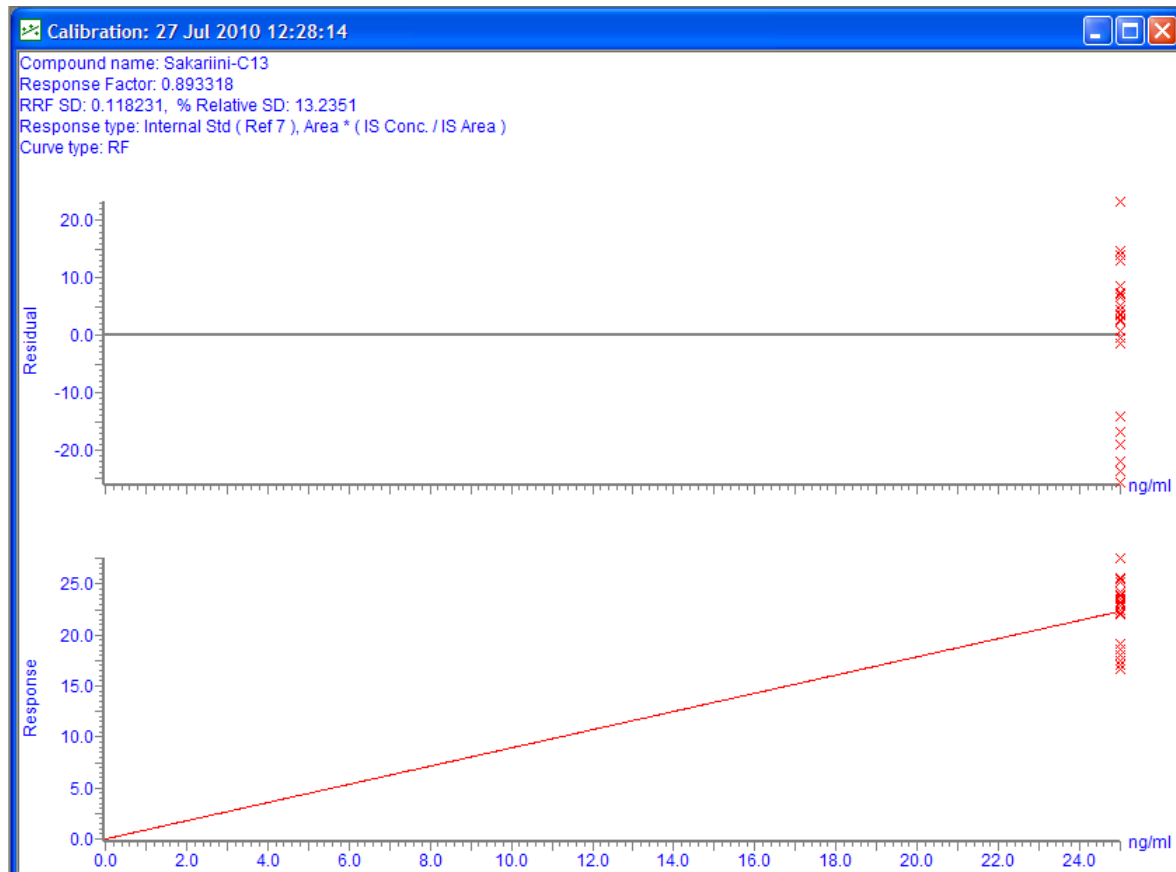
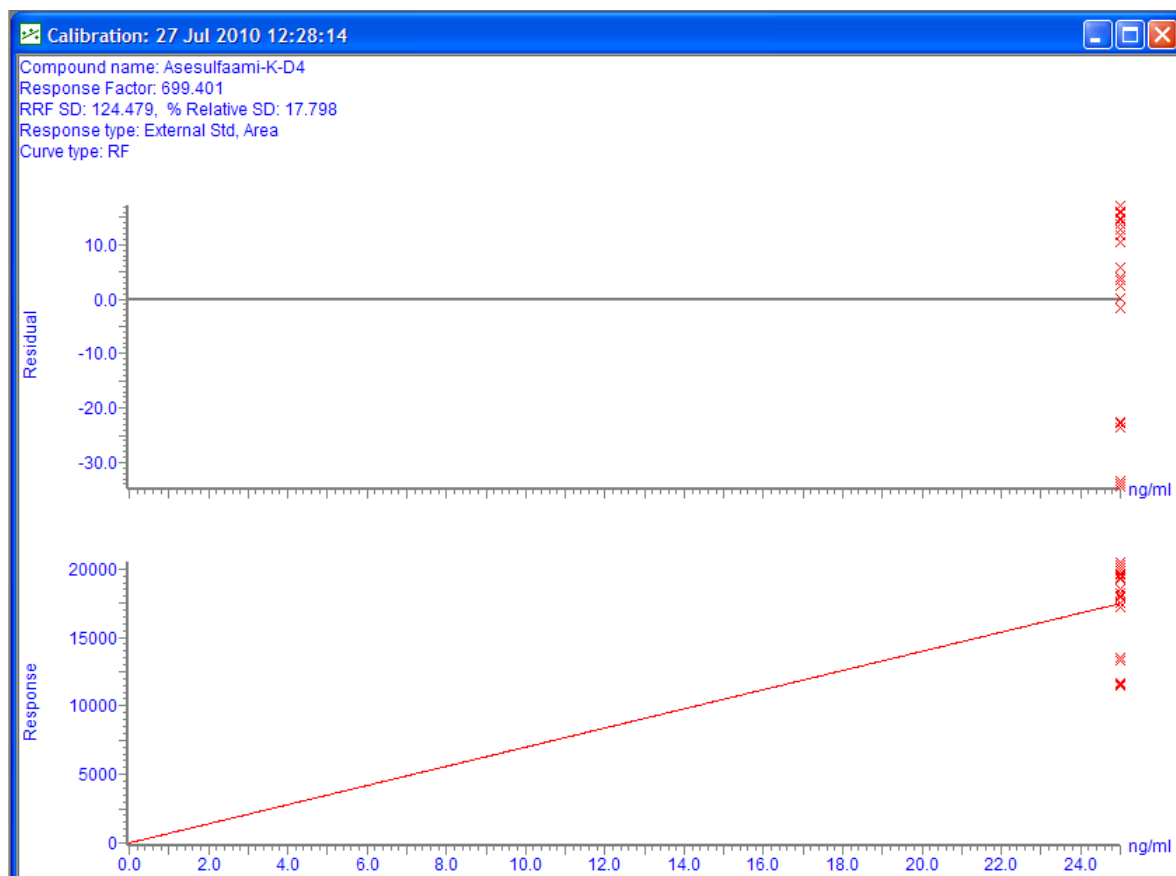
A: 4 mM CH₃COONH₄ / H₂O

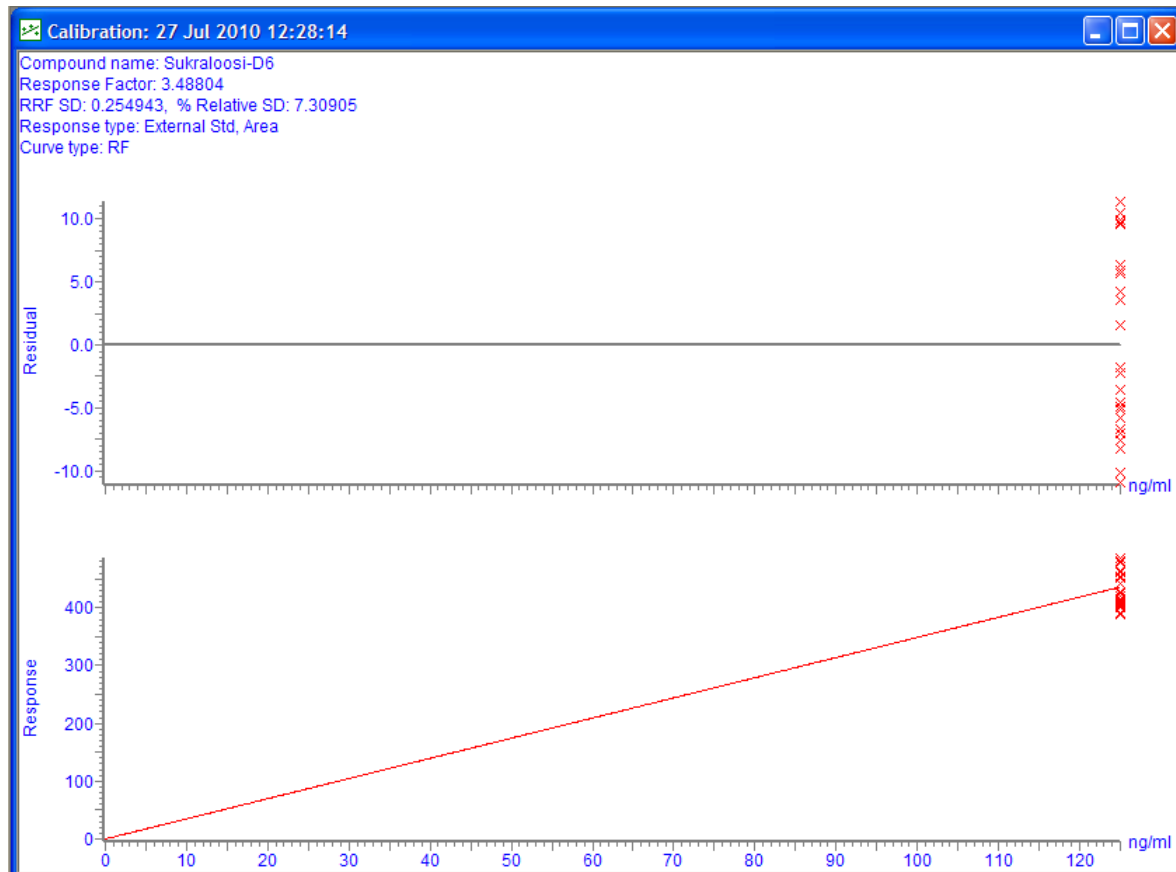
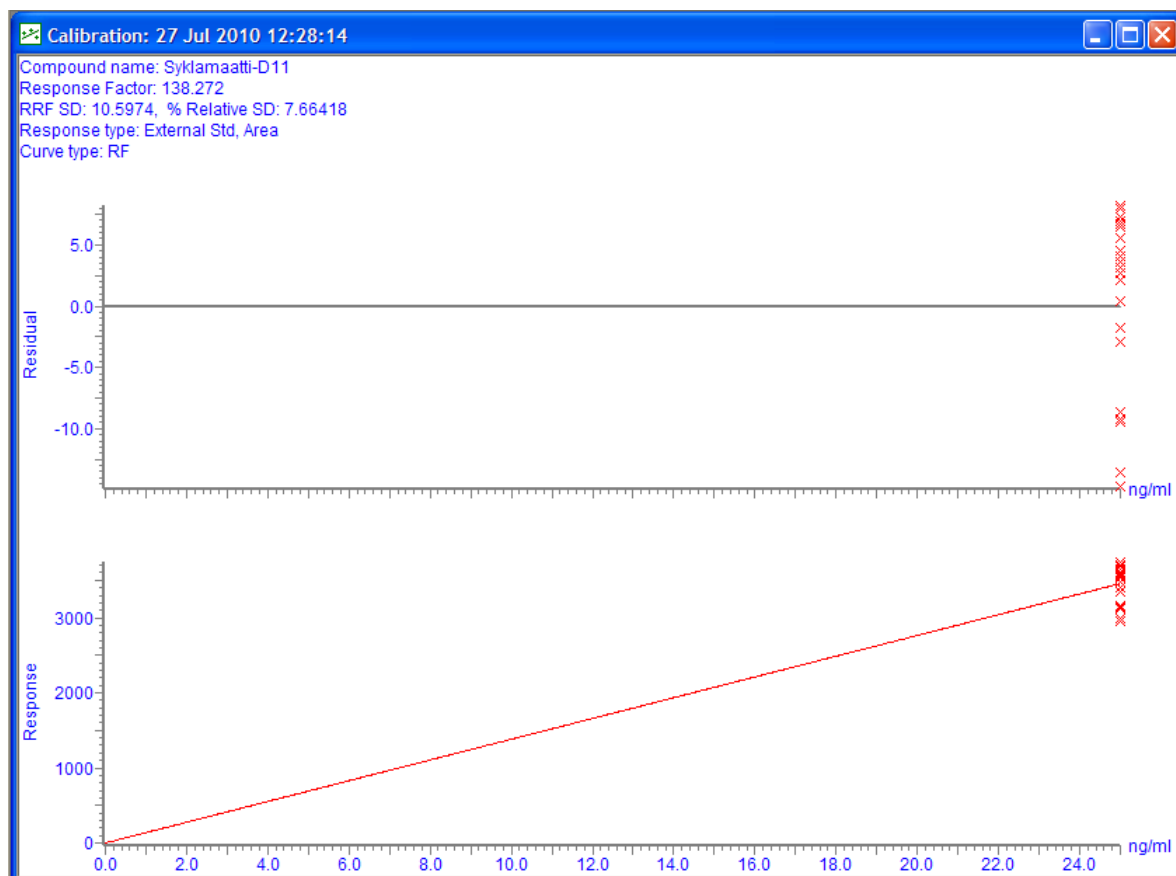
B: 4 mM CH₃COONH₄ / MeOH











Kalibrintiliuokset

- kalibrintiliuokset laimennetaan veteen metanolipohjaisesta natiivikantaliuosse-
oksesta gravimetrisesti siten, että tavoitepitoisuudet ovat ACS:lla, SAC:lla ja
CYC:lla 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml ja
100 ng/ml; SCL:n pitoisuuden puolestaan tulee olla jokaisessa kalibrintipis-
teessä viisinkertainen edellä mainittuihin nähden
- kuhunkin kalibrintiliuokseen lisätään tarkasti Hamilton-ruiskulla ¹³C-SAC-stand-
ardia sekä deuteroituja *d*-ACS ja *d*-CYC siten, että niiden pitoisuudeksi tulee
25 ng/ml; *d*-SCL-standardia lisätään siten, että pitoisuudeksi tulee 225 ng/ml;
kalibrintiliuosten taustassa MeOH:n osuus saa olla enintään 5 %

Näytteen esikäsittely

- koska säilyvyystestejä ei ole tehty, näytteet tulee säilyttää kylmiössä ja uuttaa
kahden päivän sisällä näytteenotosta, muussa tapauksessa ne on pakastettava
- kaikki työssä käytettävät astiat huuhdellaan metanolilla mahdollisten kontami-
naatioiden välttämiseksi
- näyte imusuodatetaan lasikuitusuodattimella
- pH säädetään väkevällä HCOOH:lla arvoon $2,5 \pm 0,1$
- pH-säädettyä näytettä punnitaan kahden desimaalin tarkkuudella määrä, joka ti-
lavuutena vastaa noin 50 ml:aa
- näytteeseen annostellaan metanoliin laimennettua surrogaattia tarkasti Hamil-
ton-ruiskulla siten, että kvantitoitavassa, väkevöidyssä uutteessa sen pitoisuu-
deksi saantotasolla 100 % tulee 25 ng/ml
- Bakerbond SDB 1 -SPE-patruuna kunnostetaan ensin 20 ml:lla MeOH:a ja sit-
ten 10 ml:lla 2 % HCOOH:a (aq); kunnostuksen jälkeen patruuna ei saa kuivua
ennen kuin koko näyte on uutettu
- näyte uutetaan patruunan läpi nopeudella 1 tippa/s
- patruunaa kuivataan kevyesti vakuumpumpun avulla
- analyytit eluoidaan patruunasta koeputkeen 6 ml:lla MeOH:a; eluentin virtaus-
nopeus enintään 1 tippa/s
- patruuna kuivataan lopuksi täysin kuivaksi vakuumpumpulla
- näyte haihdutetaan täysin kuiviin GeneVacin® Personal Evaporator EZ-Envi-
sentrifugaalihaihduttimen ohjelmalla *Low BP*; maksimilämpötilaksi asetetaan
35 °C ja *Final Stagen* pituudeksi 20 min näytemäärällä ≤ 5 kpl ja 25 min näyte-
määrällä > 5 kpl; haihdutusprosessin aikana vakuumi on alimmillaan 12 mbar

- haihdutusputkeen lisätään automaattipipetillä 190 µl Milli-Q-vettä ja Hamilton-ruiskulla 10 µl deutoitua metanolipohjaista standardiseosta; 200 µl:n lopputilavuudessa myös muita liuotinsuhteita voidaan soveltaa, kunhan MeOH:n osuus ei ylitä 5 % (V/V)
- deuteroidun standardiseoksen pitoisuus tulee etukäteen laimentaa sellaiseksi, että 200 µl:n kokonaistilavuudessa vallitsee kaikkien deutoitujen yhdisteiden suhteen sama pitoisuus kuin kalibrintisuoralla (*d*-ACS, *d*-CYC 25 ng/ml, *d*-SCL 225 ng/ml)
- koeputki vorteksoidaan ja sen sisältämästä 200 µl:n nestetilavuudesta mahdollisimman suuri osa siirretään pieneen Eppendorf-putkeen; siirto tehdään välittömästi veden ja standardien lisäämisen jälkeen, jotta merkittävää haihtumista ei ehdi tapahtua
- Eppendorf-putki sentrifugoidaan mikrofugilla 10 000 rpm 10 minuutin ajan
- putkesta näytettä annostellaan insertilliseen näytepulloon niin suuri tilavuus kuin mahdollista ilman, että mukaan tulee pohjasakkaa

Instrumenttialalyysi ja tulosten käsittely

- kalibrintiliuokset ja näytteet analysoidaan Watersin® UPLC-MS/MS-laitteistolla
- ajoliuokset 2 mM CH₃COONH₄/H₂O (A) ja 2 mM CH₃COONH₄/MeOH (B)
- LC-erotuksen gradientti 99,9 % A $\xrightarrow{2,0 \text{ min}}$ 0,1 % A $\xrightarrow{0,4 \text{ min}}$ 99,9 % A (3 min saakka)
- injektio-tilavuus 7,5 µl (ks. kaikki LC-asetukset taulukosta 3, s. 28)
- kontaminaatioiden välttämiseksi näytteiden välissä ajetaan yksi tai useampi liuotininjektio
- ks. yhteenveto optimoiduista ionisaatio-olosuhteista taulukosta 4, s. 29
- ks. MRM-detektion ionit ja niiden aikaikkunat taulukosta 5, s. 30
- tulokset käsitellään Watersin® MassLynx-ohjelmistoon sisältyvällä TargetLynx-sovelluksella, johon on oltava luotuna tulosten käsittelyyn soveltuva metodi
- ACS kvantitoidaan *d*-ACS vasten
- SAC kvantitoidaan *d*-CYC vasten
- ¹³C-SAC kvantitoidaan *d*-CYC vasten
- CYC kvantitoidaan *d*-CYC vasten
- SCL kvantitoidaan *d*-SCL vasten
- SAC:lle määritetyt pitoisuudet korjataan ¹³C-SAC:n saantoprosentilla; muille yhdisteille saantokorjaamista surrogaatin nojalla ei voida tehdä
- näytteiden alkuperäiset, konsentroimattomat pitoisuudet ilmoitetaan lopputuloksissa yksikössä ng/l tai µg/l